



This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

Usage guidelines

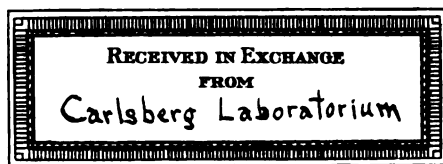
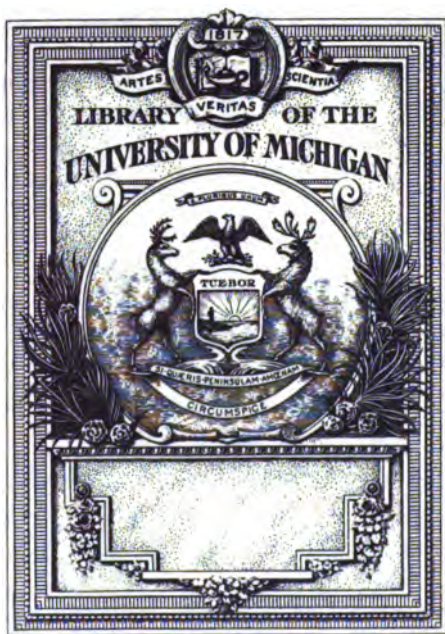
Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

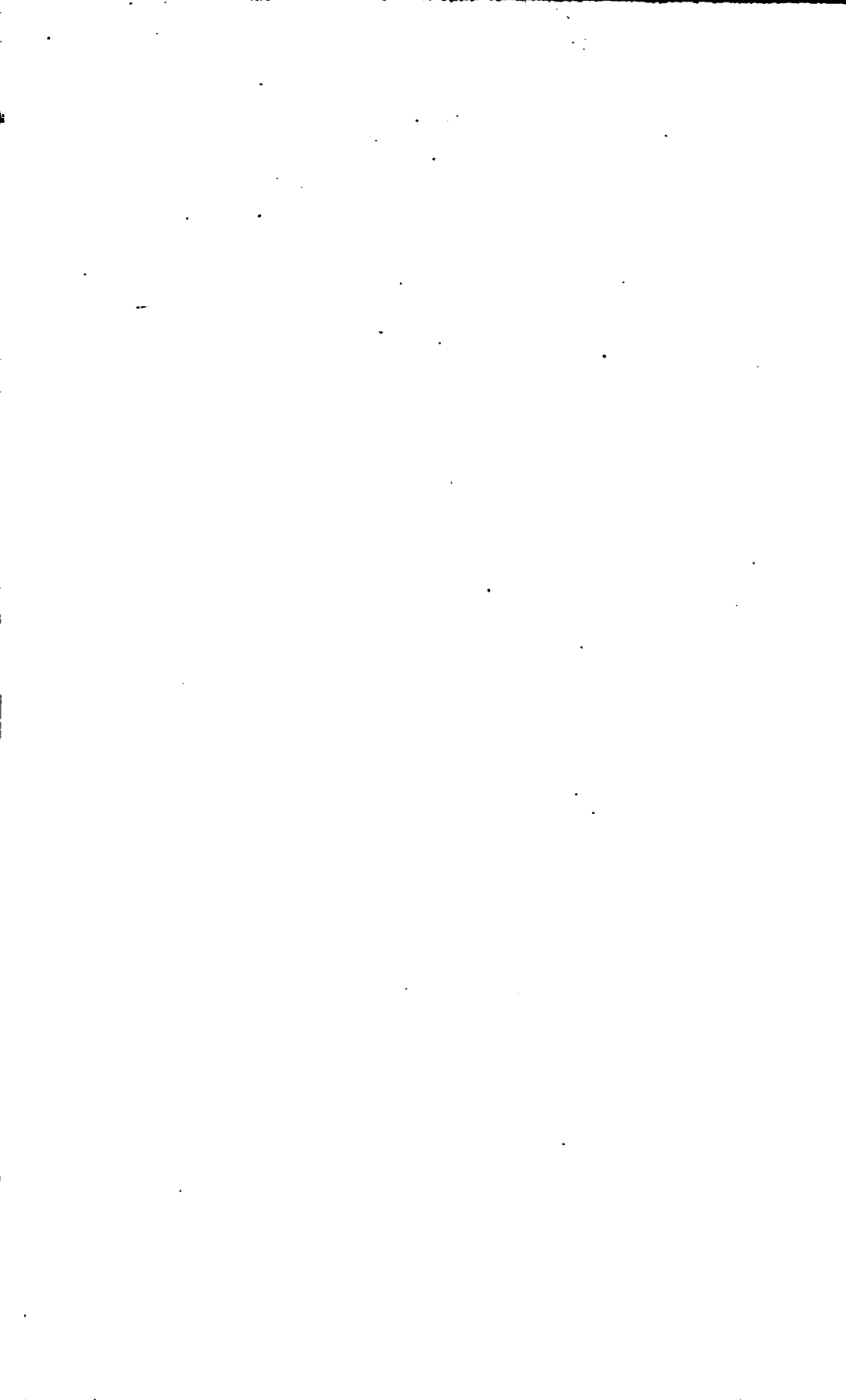
We also ask that you:

- + *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.
- + *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.
- + *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.
- + *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

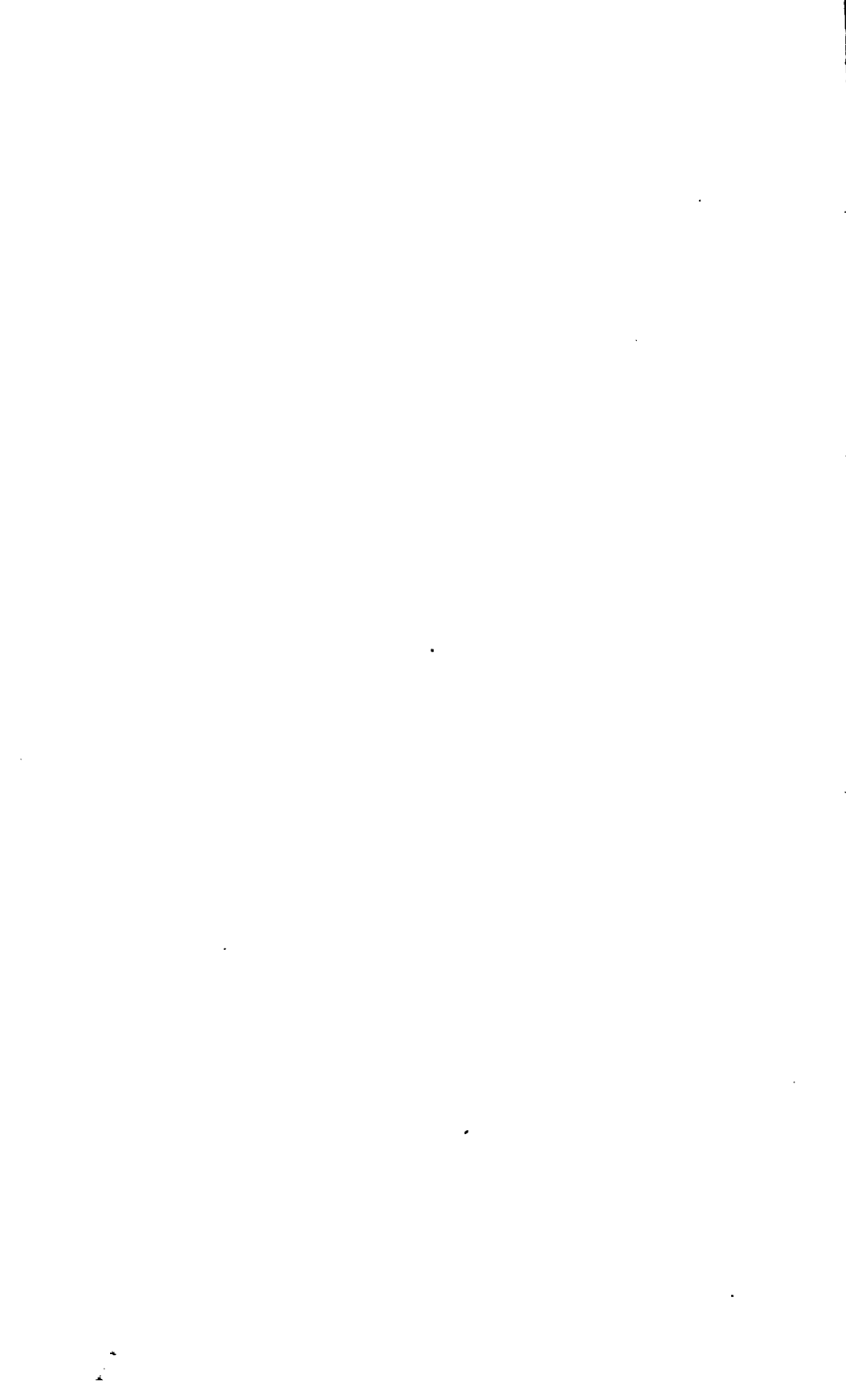
About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at <http://books.google.com/>





918
1
1



813

1

10

Carlsberg laboratoriet.

COMPTES-RENDUS

DES TRAVAUX

DU

LABORATOIRE DE CARLSBERG.

5^{ME} VOLUME.

ÉDITION FRANÇAISE.



COPENHAGUE.

EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP.

IMPRIMERIE DE THIELE.

1903.

	Page
1. <i>Saccharomyces</i>	68
Aperçu de mes recherches antérieures	68
Recherches nouvelles	74
Le bourgeonnement, p. 74. La formation de spores, p. 78. Sur les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation, p. 85.	
2. Levures alcooliques aux cellules ressemblant aux <i>Saccharomyces</i>	92
3. <i>Oidium lactis</i>	95
4. <i>Mucor</i>	95
Dosage de petites quantités d'arsenic dans les matières organiques, spécialement dans la bière et dans le moût. Par Carl Pedersen.....	108
1. Introduction.....	108
2. L'appareil de Marsh	111
3. Méthodes d'oxydation	117
4. Méthode de précipitation d'après Reinsch.....	125
5. Méthode de distillation.....	129

Troisième livraison, 1903.

Études sur les enzymes protéolytiques de l'orge en germination (du malt)
par Fr. Weis:

1. Introduction	133
Historique de la question. Le Problème	133
II. Méthodes expérimentales	149
III. Lois générales de la protéolyse	165
1. Dépendance de la température.....	167
2. Dépendance de la quantité de ferment	180
3. Dépendance de la concentration de la solution de protéine ..	184
4. Dépendance du temps.....	185
5. Dépendance du temps à des températures différentes	192
6. Dépendance du temps à des quantités de ferment différentes.	196
7. Dépendance du temps à des concentrations de protéine différentes	198
8. Dépendance de la présence de matières étrangères	203
IV. Nature et mode d'action des enzymes	227
1. Y a-t-il dans l'orge en germination plusieurs enzymes protéolytiques se laissant séparer ou préparer à l'état pur?.....	228
2. Propriétés chimiques et physiques	235
3. Influence sur des matières protéiques diverses. Points de ressemblance avec la pepsine et la trypsine animales	247
4. Les produits de dédoublement protéolytiques	256
V. Première apparition et formation des enzymes	274
1. Stade de germination	274
2. Proenzymes	279
VI. Conclusions	283

10 K
1
3 Carlsberg-Laboratort
FEB 8 1926

COMPTE-RENDU

DES TRAVAUX

DU

LABORATOIRE DE CARLSBERG.

5^{ME} VOLUME, 1^{RE} LIVRAISON.

COPENHAGUE.

EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP.

IMPRIMERIE DE THIELE.

1900.

Prix: 1,65 Kr.

TP
500
.C282

Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg.

Paraît par livraisons à des époques indéterminées. A mesure qu'il en paraîtra un nombre suffisant pour faire un volume, les abonnés recevront un titre imprimé en même temps qu'une table des matières, avec l'indication de la période qu'embrasse le volume.



TP
500
.C282

Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg.

Paraît par livraisons à des époques indéterminées. A mesure qu'il en paraîtra un nombre suffisant pour faire un volume, les abonnés recevront un titre imprimé en même temps qu'une table des matières, avec l'indication de la période qu'embrasse le volume.





J. H. Hyde



Carlsberg Laboratorium

1911

par M. Reischauer du titrage du sucre de M. Fehling. Depuis, il a préféré la méthode plus exacte de peser le précipité cuprique.

L'étude des diastases mentionnées amena Kjeldahl à des recherches physiologiques sur la transformation des hydrates de carbone pendant la germination, ainsi qu'à des questions purement chimiques, telles que le dosage simultané des divers sucres.

En 1881, en même temps que ses „Etudes sur l'invertine“ parurent les Recherches sur les hydrates de carbone de l'orge et le malt spécialement au point de vue de la présence du sucre de canne¹⁾. Outre la découverte d'une polysaccharide nouvelle, qu'on ne parvint cependant pas à isoler en état pur (l'Amylane, isolée presque en même temps par M. O'Sullivan) cet ouvrage contient ce renseignement important qu'il se forme pendant la germination de l'orge une grande quantité de sucre de canne, qui se dédouble ensuite en glycose et fructose. L'auteur y montre encore combien cette hydrolyse se fait facilement, si les organes en question sont triturés dans de l'eau, procédé analytique, comme on sait, très répandu il y a une vingtaine d'années. Il faut remarquer que c'est seulement par l'addition de substances détruisant les diastases ou qui en empêchent l'action qu'on obtient une analyse correspondante à la teneur réelle de la plante en substance hydrolysable. La trituration des matières végétales avec l'addition de carbonate de baryte en ajoutant de l'alcool concentré et chauffant ensuite est un procédé de grande importance qui paraît dater des recherches de Kjeldahl — du moins cette méthode y trouve un fondement réel. Il paraît cependant que ce mémoire est moins connu parmi les physiologistes qu'il mérite de l'être. Dans l'ouvrage en question, l'auteur cherche de même à faire le dosage simultané de divers sucres, problème dont il continua de s'occuper et qui en partie ont causé son mémoire dernier „Recherches sur l'action sur le sucre des solutions cuivriques alcalines“²⁾. Dans cet ouvrage important, Kjeldahl indique chez les méthodes d'analyse reposant sur la réduction de la solution cuivrique, une cause d'erreur jusqu'ici inaperçue. Même après les améliorations de la méthode faites par M. Maercker, M. Allihn et d'autres, il fallut dire que la concordance des dosages exécutés par différents chimistes dans différents laboratoires laissaient beaucoup à désirer tandis que l'accord de deux dosages parallèles exécutés au même laboratoire s'établit d'une facilité frappante. Kjeldahl prouve clairement

¹⁾ Carlsb. Lab. Medd. 1, 339—379 (Résumé p. 189).

²⁾ Carlsb. Lab. Medd. 4, 1—62 (Résumé p. 1—19) 1895.

Carlsberg Laboratorium
24
1-30-1926

JOHAN KJELDAHL.

L'Administration du laboratoire de Carlsberg m'a demandé de faire la biographie du chef de la section chimique du laboratoire, M. le professeur Johan Kjeldahl, décédé le 18 juillet 1900. Je tâcherai donc de donner un aperçu des travaux scientifiques de Kjeldahl et ensuite d'ajouter quelques mots sur sa personnalité sympathique et originale.

La réputation universelle de Kjeldahl est due a sa méthode de dosage de l'azote dans les substances organiques, publiée en 1883¹⁾ et appliquée maintenant dans tous les laboratoires où se font des analyses chimiques des substances animales et végétales. L'utilité de la méthode a été et est toujours d'une importance remarquable. Quiconque a connu par expérience les procédés de la méthode Will-Varrentrap, se souviendra avec reconnaissance de la facilitation énorme que marqua la méthode Kjeldahl, surtout pour l'analyse des liquides organiques. Que le dosage de l'azote fût peut-être la méthode quantitative de l'exécution la plus facile, a naturellement beaucoup favorisé l'étude de la transformation des matières azotées dans les organismes. Kjeldahl avait absolument raison en supposant que par sa méthode on pourrait traiter de telles questions jusqu'ici insuffisamment traitées à cause de la difficulté et la longue durée des méthodes antérieures d'autant plus inapplicables que les matières en question sont ordinairement de caractère changeant. Ce furent donc, avant toutes autres, les sciences physiologiques qui profitèrent de cette méthode; il va sans dire qu'elle

¹⁾ La méthode de dosage de Kjeldahl fut communiqué pour la première fois par une conférence à la Société chimique de Copenhague, le 7 mars 1883 et imprimée pour la première fois dans le Zeitschrift für analytische Chemie T. 22 p. 366 daté mars 1883; ensuite en forme plus détaillée au mois de juin de la même année dans le Compte-Rendu du laboratoire de Carlsberg T. 2, p. 1—27 (Résumé p. 1).

par M. Reischauer du titrage du sucre de M. Fehling. Depuis, il a préféré la méthode plus exacte de peser le précipité cuprique.

L'étude des diastases mentionnées amena Kjeldahl à des recherches physiologiques sur la transformation des hydrates de carbone pendant la germination, ainsi qu'à des questions purement chimiques, telles que le dosage simultané des divers sucres.

En 1881, en même temps que ses „Etudes sur l'invertine“ parurent les Recherches sur les hydrates de carbone de l'orge et le malt spécialement au point de vue de la présence du sucre de canne¹⁾. Outre la découverte d'une polysaccharide nouvelle, qu'on ne parvint cependant pas à isoler en état pur (l'Amylane, isolée presque en même temps par M. O'Sullivan) cet ouvrage contient ce renseignement important qu'il se forme pendant la germination de l'orge une grande quantité de sucre de canne, qui se dédouble ensuite en glycose et fructose. L'auteur y montre encore combien cette hydrolyse se fait facilement, si les organes en question sont triturés dans de l'eau, procédé analytique, comme on sait, très répandu il y a une vingtaine d'années. Il faut remarquer que c'est seulement par l'addition de substances détruisant les diastases ou qui en empêchent l'action qu'on obtient une analyse correspondante à la teneur réelle de la plante en substance hydrolysable. La trituration des matières végétales avec l'addition de carbonate de baryte en ajoutant de l'alcool concentré et chauffant ensuite est un procédé de grande importance qui paraît dater des recherches de Kjeldahl — du moins cette méthode y trouve un fondement réel. Il paraît cependant que ce mémoire est moins connu parmi les physiologistes qu'il mérite de l'être. Dans l'ouvrage en question, l'auteur cherche de même à faire le dosage simultané de divers sucres, problème dont il continua de s'occuper et qui en partie ont causé son mémoire dernier „Recherches sur l'action sur le sucre des solutions cuivriques alcalines“²⁾. Dans cet ouvrage important, Kjeldahl indique chez les méthodes d'analyse reposant sur la réduction de la solution cuivrique, une cause d'erreur jusqu'ici inaperçue. Même après les améliorations de la méthode faites par M. Maercker, M. Allihn et d'autres, il fallut dire que la concordance des dosages exécutés par différents chimistes dans différents laboratoires laissaient beaucoup à désirer tandis que l'accord de deux dosages parallèles exécutés au même laboratoire s'établit d'une facilité frappante. Kjeldahl prouve clairement

¹⁾ Carlsb. Lab. Medd. 1, 339—379 (Résumé p. 189).

²⁾ Carlsb. Lab. Medd. 4, 1—62 (Résumé p. 1—19) 1895.

que les divergences mentionnées dependent de l'accès plus ou moins facile de l'oxygène au liquide pendant la réaction: c'est que la quantité d'oxydure cuprique précipité diminue (à l'accès de l'oxygène) au même degré qu'il est facile à l'oxygène de pénétrer. La réforme radicale de la méthode amenée par cette découverte fut donc le chauffage du liquide en question dans un courant d'hydrogène. On obtient de cette manière beaucoup plus d'exactitude que par le procédé ordinaire. Il est évident que les tableaux faits auparavant par différents savants sur le rapport chez les divers sucres entre la quantité d'oxydure cuprique précipité et la quantité de sucre présent durent subir une revision, et Kjeldahl a également fait ce travail. On a contesté l'importance pour la pratique analytique de ces tableaux ayant trait seulement aux sucres purs, mais l'essence même de la chose: l'exclusion de l'oxygène du liquide cuivrique pendant la réaction, a été absolument confirmée et on doit à Kjeldahl l'honneur d'un progrès remarquable de l'analyse du sucre. La réaction mentionnée a d'ailleurs été l'objet de recherches spéciales de Kjeldahl. Il trouva, qu'en appliquant le liquide Soldaini à l'oxydation du glycose il se forme en grande quantité de l'acide méso-oxalique. La continuation de ces recherches fournirait sans doute des renseignements bien intéressants.

Kjeldahl se livra avec un intérêt tout particulier à l'étude du pouvoir rotatoire des matières protéiques végétales et de leur solubilité dans de l'alcool de concentration différente. Il n'a publié sur ces matières qu'une communication donnée au congrès des naturalistes scandinaves en 1892, laquelle se trouve dans le présent livraison des Comptes rendus du laboratoire de Carlsberg. Citons comme exemple des résultats, que toutes préparations de matières protéiques qui, extraites à l'aide d'alcool à 55 p. c. et précipitées par un refroidissement à température très basse, peuvent être gagnées de la farine de froment, avaient pour ainsi dire à peu près la même teneur en azote (moy. 17,25 p. c.) et en carbone (env. 52 p. c.) et qu'elles avaient toutes, dissoutes dans de l'alcool à 55 p. c. un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = +92^\circ$. Ce nombre dernier se montra remarquablement constant même pour les préparations de blés de zones très différentes et de toutes les quatre années dont la récolte avait été analysée jusqu'à 1892. Il paraît ressortir de ce fait que la farine de froment ne renferme qu'une seule matière protéique soluble dans l'alcool, et non pas trois matières différentes comme était d'avis M. Ritthausen. Des recherches analogues donnèrent chez la matière protéique du seigle soluble dans l'alcool: $[\alpha]_D = +121^\circ$. Ici, Kjeldahl a commencé des recherches

d'un grand intérêt chimico-biologique qui contribueront à frayer le chemin à une caractéristique plus exacte des modifications spéciales des matières végétales les plus répandues.

Kjeldahl attribua un grand intérêt à ces recherches. On ne saura dire, si, en poursuivant ces études, il aura rencontré des difficultés particulières qui ont retardé la marche des recherches, il est toujours déplorable que huit ans se soient passées sans amener de plus amples publications.

Outre les travaux mentionnés plus haut qui, pour une partie, sont du même ordre, Kjeldahl a publié quelques petits mémoires: sur la neurine comme élément de la bière¹⁾, quelques remarques sur l'emploi de l'oxyde de mercure dans l'analyse élémentaire des substances organiques²⁾. Dans ce mémoire se trouve encore la description d'un ballon de décomposition perfectionné.

En regardant l'oeuvre de Kjeldahl, on y aperçoit partout une tendance au développement des méthodes exactes. Aussi la grande considération dont jouit Kjeldahl est-elle due à sa qualité de créateur de méthodes analytiques excellentes. Sa prédilection pour les procédés méthodiques correspond à son vif intérêt pour la physique dont il appréciait la méthodologie exacte.

Pendant sa jeunesse, il se livrait tout autant aux études physiques qu'aux études chimiques. Dans ses premières années à Carlsberg, il s'occupait encore de temps en temps d'études également méthodologiques de certaines questions concernant l'électricité; plus tard, il suivait avec grand intérêt le développement de la chimie physique moderne. Comme on le pense bien, l'indication de M. Hill que l'action de la maltase serait nettement réversible, l'intéressa vivement. Les recherches provisoires qu'il fit faire à cette occasion ne donnèrent qu'un résultat négatif, ce qui ne prouve cependant pas que M. Hill aurait tort. Il est vrai que les recherches de Kjeldahl sur l'amylase de malt lui donnèrent la conviction que même une accumulation considérable des produits de l'hydrolyse reste sans action sur l'action de la diastase en question. A juger de là, on citerait peut-être ces recherches en défaveur de celles de M. Hill. Malheureusement, nous regrettons la participation de Kjeldahl à l'étude de ces questions importantes, traitées, à ce qu'il paraît, souvent un peu légèrement par les adhérents comme par les adversaires de la manière de voir de M. Hill.

¹⁾ Carlsb. Lab. Medd. 3, 79—87 (Résumé p. 67) 1891.

²⁾ Carlsb. Lab. Medd. 3, 110—121 (Résumé p. 98) 1891.

Johan Gustav Christoffer Thorsager Kjeldahl, né le 16 août 1849, était fils de M. Kjeldahl, médecin à Jægerspris dans le Seeland du nord et de sa femme, née Lohmann. En 1867, il passa son baccalauréat au collège de Roskilde et en 1873, en achevant ses études à l'Ecole supérieure des arts et métiers à Copenhague, il y reçut la note supérieure. La même année il fut préparateur chez M. le professeur Barfoed au laboratoire chimique de l'Académie royale d'Agriculture de Copenhague en même temps qu'il assistait quelquefois aux expériences de M. Fjord. M. Barfoed présenta Kjeldahl à M. J.-C. Jacobsen, le fondateur du laboratoire de Carlsberg, lequel l'engagea comme chimiste dès le 1. mai 1875. Peu de temps après, à la création du Fonds de Carlsberg, l'administration du laboratoire passa à cette institution, et Kjeldahl fut nommé chef de la section chimique à partir du 1. octobre 1876. Son oeuvre pendant les 25 ans qu'il passa à Carlsberg a été mentionnée plus haut. Ajoutons ici qu'il lui était toujours un véritable plaisir de contribuer à ce que les jeunes gens qui lui étaient attachés pussent se perfectionner dans leurs études scientifiques ou techniques. Il leur accorda ainsi avec libéralité du temps pour des travaux personnels et les aidait de ses conseils de la manière la plus bienveillante. Des techniciens et des savants hors du personnel du laboratoire ont quelquefois travaillé sous la direction de Kjeldahl et ont joui de ses connaissances étendues.

En 1890, Kjeldahl fut élu membre de l'Académie Royale des Sciences et des Lettres de Danemark, en 1892 de l'Académie des Sciences de Christiania, la même année il reçut le titre de „Professor“. En 1894 il fut nommé docteur ès sciences honoraire à l'Université de Copenhague, et en 1898, il reçut le croix de chevalier de l'ordre du Danebrog.

Souffrant depuis quelques années d'une certaine dépression morale, sorte d'épuisement du cerveau sans doute, dont il paraissait presque rétabli après un séjour dans le Midi et en Norvège, Kjeldahl mourut subitement en se baignant à la plage de Tisvilde, en Seeland. Un coup de sang termina sa vie.

Depuis bien des années déjà, Kjeldahl souffrait de temps à autre d'une fatigue morale qui l'empêchait dans ces travaux scientifiques. Ce fut pendant de telles crises surtout qu'il regrettait, à côté de ses recherches au laboratoire, le bienfait stimulant qu'amène les devoirs d'un professeur chargé de cours réglés. Son esprit pétillant, son amour de l'art et de la littérature s'empara pour ainsi dire d'une partie de ses forces. Ajoutez à cela une santé un peu délicate, et l'on comprendra qu'il lui était impossible de poursuivre ses recherches

d'un grand intérêt chimico-biologique qui contribueront à frayer le chemin à une caractéristique plus exacte des modifications spéciales des matières végétales les plus répandues.

Kjeldahl attribua un grand intérêt à ces recherches. On ne saura dire, si, en poursuivant ces études, il aura rencontré des difficultés particulières qui ont retardé la marche des recherches, il est toujours déplorable que huit ans se soient passées sans amener de plus amples publications.

Outre les travaux mentionnés plus haut qui, pour une partie, sont du même ordre, Kjeldahl a publié quelques petits mémoires: sur la neurine comme élément de la bière¹⁾, quelques remarques sur l'emploi de l'oxyde de mercure dans l'analyse élémentaire des substances organiques²⁾. Dans ce mémoire se trouve encore la description d'un ballon de décomposition perfectionné.

En regardant l'oeuvre de Kjeldahl, on y aperçoit partout une tendance au développement des méthodes exactes. Aussi la grande considération dont jouit Kjeldahl est-elle due à sa qualité de créateur de méthodes analytiques excellentes. Sa prédilection pour les procédés méthodiques correspond à son vif intérêt pour la physique dont il appréciait la méthodologie exacte.

Pendant sa jeunesse, il se livrait tout autant aux études physiques qu'aux études chimiques. Dans ses premières années à Carlsberg, il s'occupait encore de temps en temps d'études également méthodologiques de certaines questions concernant l'électricité; plus tard, il suivait avec grand intérêt le développement de la chimie physique moderne. Comme on le pense bien, l'indication de M. Hill que l'action de la maltase serait nettement réversible, l'intéressa vivement. Les recherches provisoires qu'il fit faire à cette occasion ne donnèrent qu'un résultat négatif, ce qui ne prouve cependant pas que M. Hill aurait tort. Il est vrai que les recherches de Kjeldahl sur l'amylase de malt lui donnèrent la conviction que même une accumulation considérable des produits de l'hydrolyse reste sans action sur l'action de la diastase en question. A juger de là, on citerait peut-être ces recherches en défaveur de celles de M. Hill. Malheureusement, nous regrettons la participation de Kjeldahl à l'étude de ces questions importantes, traitées, à ce qu'il paraît, souvent un peu légèrement par les adhérents comme par les adversaires de la manière de voir de M. Hill.

¹⁾ Carlsb. Lab. Medd. 3, 79—87 (Résumé p. 67) 1891.

²⁾ Carlsb. Lab. Medd. 3, 110—121 (Résumé p. 98) 1891.

Johan Gustav Christoffer Thorsager Kjeldahl, né le 16 août 1849, était fils de M. Kjeldahl, médecin à Jægerspris dans le Seeland du nord et de sa femme, née Lohmann. En 1867, il passa son baccalauréat au collège de Roskilde et en 1873, en achevant ses études à l'Ecole supérieure des arts et métiers à Copenhague, il y reçut la note supérieure. La même année il fut préparateur chez M. le professeur Barfoed au laboratoire chimique de l'Académie royale d'Agriculture de Copenhague en même temps qu'il assistait quelquefois aux expériences de M. Fjord. M. Barfoed présenta Kjeldahl à M. J.-C. Jacobsen, le fondateur du laboratoire de Carlsberg, lequel l'engagea comme chimiste dès le 1. mai 1875. Peu de temps après, à la création du Fonds de Carlsberg, l'administration du laboratoire passa à cette institution, et Kjeldahl fut nommé chef de la section chimique à partir du 1. octobre 1876. Son oeuvre pendant les 25 ans qu'il passa à Carlsberg a été mentionnée plus haut. Ajoutons ici qu'il lui était toujours un véritable plaisir de contribuer à ce que les jeunes gens qui lui étaient attachés pussent se perfectionner dans leurs études scientifiques ou techniques. Il leur accorda ainsi avec libéralité du temps pour des travaux personnels et les aidait de ses conseils de la manière la plus bienveillante. Des techniciens et des savants hors du personnel du laboratoire ont quelquefois travaillé sous la direction de Kjeldahl et ont joui de ses connaissances étendues.

En 1890, Kjeldahl fut élu membre de l'Académie Royale des Sciences et des Lettres de Danemark, en 1892 de l'Académie des Sciences de Christiania, la même année il reçut le titre de „Professor“. En 1894 il fut nommé docteur ès sciences honoraire à l'Université de Copenhague, et en 1898, il reçut le croix de chevalier de l'ordre du Danebrog.

Souffrant depuis quelques années d'une certaine dépression morale, sorte d'épuisement du cerveau sans doute, dont il paraissait presque rétabli après un séjour dans le Midi et en Norvège, Kjeldahl mourut subitement en se baignant à la plage de Tisvilde, en Seeland. Un coup de sang termina sa vie.

Depuis bien des années déjà, Kjeldahl souffrait de temps à autre d'une fatigue morale qui l'empêchait dans ces travaux scientifiques. Ce fut pendant de telles crises surtout qu'il regrettait, à côté de ses recherches au laboratoire, le bienfait stimulant qu'amène les devoirs d'un professeur chargé de cours réglés. Son esprit pétillant, son amour de l'art et de la littérature s'empara pour ainsi dire d'une partie de ses forces. Ajoutez à cela une santé un peu délicate, et l'on comprendra qu'il lui était impossible de poursuivre ses recherches

avec un zèle soutenu, imperturbable. C'était un homme de génie une nature riche, il ne fut jamais un travailleur proprement dit. Aussi ses travaux ne furent-ils pas considérables comme quantité, mais sa production était toujours de premier ordre.

Pour la science, le décès de Kjeldahl signifie donc la perte d'un talent supérieur et original, qui a rendu honneur à notre petite patrie; ses amis regrettent la perte d'une personnalité noble et distinguée. Kjeldahl était aimée de tous ceux qui eurent le bonheur de le connaître.

W. JOHANNSEN.

Recherches sur le pouvoir rotatoire de quelques matières protéiques végétales.

Par

J. Kjeldahl.

Communication présentée au Congrès des Naturalistes Scandinaves à
Copenhague 1892.

Les matières protéiques se transformant souvent très vite sous l'action de dissolvants acides et surtout alcaliques, il faut, pour gagner ces matières en un état non altéré, tâcher autant que possible d'employer des dissolvants neutres. Les matières protéiques végétales s'en laissent ordinairement peu influencer, sauf les globulines solubles dans de l'eau salée lesquelles sont généralement présentes en très petite quantité. Encore une exception est formée par les grains des divers blés contenant en grande quantité un certain groupe de matières protéiques: les matières protéiques du gluten, solubles dans de l'alcool dilué, insolubles dans l'alcool pur et dans l'eau et par conséquent facilement accessibles. Aussi ont elles été l'objet de recherches très nombreuses, parmi lesquelles celles de M. Ritthausen (*Die Eiweisskörper der Getreidearten und der Oelsamen* 1872) ont été particulièrement détaillées et ont préalablement terminé les traitements de ce sujet.

La caractérisation de l'individualité chimique des matières protéiques compte parmi les problèmes difficiles à résoudre. Les rapports de solubilité et les qualités physiques n'offrent aucun point d'appui fixe. Leur composition élémentaire n'est pas non plus toujours décisive, à cause du peu de différence qui se trouve à cet égard entre les matières protéiques en tout. En examinant les chiffres de M. Ritthausen, on trouve souvent plus de divergence entre les différentes analyses de la même substance qu'entre les analyses de matières prétendues diverses. La nature et les proportions quantitatives des produits obtenus de la décomposition par ébullition en présence d'acide dilué servent souvent

d'indication, mais la séparation quantitative de ces produits ne se laisse pas accomplir à cause de leur solubilité facile.

Un critérium assez utile, jusqu'ici apparemment peu employé à la caractérisation de ces matières est fourni par le pouvoir rotatoire optique. Les matières protéiques du gluten, comme toutes les matières protéiques, faisant tourner la lumière polarisée fortement à gauche, et l'indice $[\alpha]_D$ étant très variable mêmes chez des substances d'ailleurs parentes, il serait à espérer qu'on y trouverait un moyen de faire des séparations dans ce groupe.

Mes recherches ont particulièrement regardé la farine de froment qui contient la plus grande quantité des substances mentionnées et qui, par M. Ritthausen et d'autres, ont été le plus spécialement traitée. J'ai trouvé que la quantité des matières protéiques extraite par l'alcool dilué dépend entièrement de la concentration de cet alcool. Si l'on marque les résultats obtenus sur un schème graphique dont les abscisses indiquent la concentration de l'alcool (0 à 100 p. c.) et les ordonnées l'azote dissous (en p. c. d'azote total) la courbe montrera un minimum à 20 p. c. d'alcool, un maximum à 55 p. c., tandis qu'à 90 p. c. elle se rapprochera à la ligne des abscisses. Au contraire, la quantité d'azote dissous ne dépend que peu de la quantité d'alcool employée, de la durée de l'action et même de la température. En tout cas, l'alcool à 55 p. c. bouillant n'en extrait guère plus de la farine fine que l'alcool de température ordinaire. Des extractions ne furent donc exécutées qu'avec de l'alcool à 55 p. c. de température ordinaire. Presque toujours, la matière protéique fut gagnée par refroidissement de cette solution au moyen d'un mélange réfrigérant. La substance fut plusieurs fois dissoute et ensuite encore précipitée par refroidissement. Enfin la matière protéique fut précipité par de l'alcool absolu en grande quantité, traitée avec de l'éther et séchée dans le vide. Une précipitation fractionnée eut lieu par refroidissement à des températures décroissantes limitées, par ex. de 16° — 5° , de 5° — 0° , de 0° — $+10^{\circ}$, une seule fois par distillation fractionnée de l'alcool.

Sauf quelques rares exceptions, toutes les préparations continrent 17,25 p. c. Az et environ 52 p. c. C et posséderent, dissoutes dans de l'alcool à 55 p. c. un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = +92^{\circ}$. Ce nombre est remarquablement stable, de sorte qu'on ne le trouve pas seulement chez toutes les fractions mentionnées, mais aussi chez toutes les préparations gagnées des échantillons du froment venu des zones les plus différentes (de Danube, de Californie, de Danemark) et provenant des quatre années dont j'ai eu jusqu'ici l'occasion d'analyser les récoltes.

Ceci surtout paraît indiquer que le froment
matière protéique soluble dans l'alcool. On
on sait, en suppose la présence de trois

La rotation optique de cette matière
acétique dépend essentiellement de la
dissolution par l'acide glaciaire mon
acétique très dilué (de 5 p. c. descendant
[α]_D = +111. Chez les solutions dans
paraît avoir la même valeur que dans
En appliquant du phénol, [α]_D se trouve
ture de 40 degrés.

Chez la farine de seigle, la courbe de
aspect que chez la farine de froment. Ici
de même un peu plus que la moitié de l'azote
s'isole facilement en état pur, et le rendement
trouve ici chez les solutions dans l'alcool
dans des acides dilués (acide acétique ou
÷ 144°, dans l'acide glacial [α]_D = +165
température de 40°, [α]_D = +157°. Az =

La courbe de solubilité de la farine d'orge
cédantes; la quantité d'azote soluble dans l'acide
ici que la moitié de la substance entière. Az =

- [α]_D = +111° dans l'alcool à 55 ;
- „ = +130° dans l'acide acétique ;
- „ = +149° dans le phénol.

La valeur d'[, α]_D est bien moins stable que celle

La farine d'avoine rend le plus de glutine
relativement peu du reste et la glutine passe facile
soluble. Les solutions vineuses ne se laissent
assez limpides pour faire la polarisation. Dans l'eau
et dans la soude on trouvait [α]_D = +83° (?).

La courbe de solubilité de la farine de maïs
des précédentes en ce qu'il a son maximum à 40
tandis que le minimum se trouve à 75-85 p. c.
protéique ne peut pas être gagné par le trépanement
et par le trépanement avec de l'eau à 75 p. c.
dans l'acide glacial [α] = +111° que dans l'acide
rotéique plus soluble que dans l'acide glacial
de solubilité et de solubilité de la farine de maïs

tions dans l'acide acétique atténué sont précipités quantitativement par l'addition d'un peu de sel gemme. Une très petite quantité de ce sel (et d'autres sels) produit une diminution de l'indice $[\alpha]_D$ (la glutine de seigle par ex. dans l'acide acétique dilué seul donne $[\alpha]_D = +144^\circ$, avec 0,1 p. c. NaCl = $+136^\circ$, avec 0,2 p. c. = $+128^\circ$).

L'addition de sels à l'alcool dilué produit un effet contraire: L'alcool à 55 p. c. saturé avec du sel marin (9 p. c.) et surtout saturé à demi avec de la chlorure de calcium (env. 16 p. c.) a bien plus de pouvoir dissolvant que l'alcool pur, tandis que le pouvoir rotatoire de cette sorte de solutions paraît dépasser un peu le degré de rotation normal. Ainsi, la glutine de froment donna, dans de l'alcool à 55 saturé avec du sel commun: $[\alpha]_D = +95^\circ$ (au lieu de $+92^\circ$). De cette manière, se dissolvent bien des matières protéiques autrement insolubles dans de l'alcool dilué par ex. la conglutine, la légumine de pois et la caséine de lait de vache.

Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques

Par

Emil Chr. Hansen.

X.

La variation des Saccharomyces.

1. Introduction.

Durant ces dernières années, les microorganismes se sont presque fait une mauvaise réputation de variabilité; toutefois, en y regardant de près, on les trouve à peine plus variables que les végétaux supérieurs; mais leurs générations se produisent avec beaucoup plus de rapidité et, par suite, les phénomènes de variation apparaissent aussi plus vite. Ici l'expérimentateur peut être témoin de transformations remarquables en peu de temps. En pratique il y a plus, car les microorganismes nous suscitent par leur variation plus de difficultés que les plantes supérieures. Voulons-nous définir tel ou tel microorganisme, il nous faut à propos de chaque caractère faire un essai spécial de culture et ne demander qu'à la somme des caractères ainsi obtenus les renseignements sur l'espèce en face de laquelle nous sommes. Ici nous n'avons pas l'habitus comme point de ralliement, et la voie qui nous est prescrite est conséquemment longue et pénible.

C'est le contraire chez les Phanérogames: leur floraison nous révèle d'un seul coup les caractères les plus importants. Il est vrai qu'on y trouve aussi des variations: ainsi la même plante peut présenter des branches à feuilles éparses ou opposées, ainsi que de grandes variations dans la configuration du limbe, et l'on peut constater, pour les organes floraux, de grandes oscillations à l'égard du nombre, des dimensions, de la couleur et de la forme; mais s'il nous manque quelqu'un des caractères essentiels, nous pouvons aussitôt trouver dans les autres un point de repère, sans être forcés à leur appliquer l'appel individuel dans des expériences souvent longues, comme dans le cas des



Fig. 5. Levure basse n° 1 de Carlsberg.
Végétation en culture en moût à $7^{\circ}\frac{1}{2}$ C., après ensemencement avec des cellules d'une culture en solution de saccharose qui avait séjourné un an à la température ordinaire. Grossissement linéaire de 1000 fois.

du Laboratoire de 1883, p. 42. On a constaté que, cultivées dans le moût à 27° et à $7^{\circ}\frac{1}{2}$ C., des végétations qui avaient séjourné

mémoires. MM. Nielsen, Klöcker et Schiønning, attachés au Laboratoire, m'ont prêté leur concours pour faire les analyses.

2. Aperçu de mes premières recherches et nouveaux contingents à ces études.

Forme des cellules.

Le point de départ des recherches sur la variation doit naturellement être une culture absolument pure, basée sur une cellule unique. Toutefois, même dans une pareille culture, le microscope révèle immédiatement à l'observateur la diversité des individus. Telle cellule ne ressemble pas à telle autre. On peut même en dire autant des espèces qui, comme le *Saccharomyces cerevisiæ* I, présentent les individus les plus uniformes. Le type de la cellule du *Saccharomyces* peut se modifier depuis la forme de sphère parfaite jusqu'à celle de l'ovale, jusqu'à la forme d'un œuf plus ou moins en pointe, d'un boudin allongé ou d'un simulacre de bactérie. La cellule peut se ramifier et affecter les formes les plus baroques. Ces formes peuvent prendre différentes dimensions et se retrouvent dans toutes les espèces; chaque individu peut fonder une végétation, composée de tous les types susdits. (Touchant l'importance de ces observations pour la description des espèces, voir *Compte rendu du Laborat. Carlsberg II*, pp. 37 et 44 (1883)).

Dans le mémoire cité, j'ai également fait ressortir la variation au point de vue des formes, dimensions et nombre des spores dans la cellule mère. Hormis les espèces comme le *Sacch. anomalus*, dont les spores sont en forme de chapeau ou d'hémisphère, les espèces figurent en général à spores sphériques; c'est là la forme typique; mais il n'est pas rare qu'elle passe à celle de rognon ou d'œuf; le *Sacch. membranæfaciens* est bien l'espèce qui présente la plus grande variation dans les sens précités.

Les cellules de certaines espèces ont plus de tendance que d'autres à prendre les formes allongées; c'est ce qu'on peut affirmer en particulier du groupe *Sacch. Pastorianus*. Au début de l'évolution, ce sont généralement les cellules rondes, les ovales et les grandes qui prédominent, tandis que les phases ultérieures abondent surtout en cellules allongées et en petites. Chez le *Sacch. apiculatus* j'ai observé (*Compte rendu du Laborat. Carlsberg I*, 172 (1881)) que les cellules citriformes se produisent surtout au commencement du bourgeonnement, et prennent alors le dessus. Dans les cultures à l'eau et à la gélatine qui ont vieilli, il n'est pas rare de trouver de petites cellules ressemblant à des bactéries, ainsi que des cellules d'un

microorganismes. Quant au sens, les variations sont essentiellement identiques chez les Phanérogames et chez les Cryptogames.

En expérimentant assez longtemps sur les diverses levures, on observe inévitablement toute une série de variations différentes. Presque tous mes traités appartenant à la présente série viennent à l'appui de cette assertion, depuis le premier, paru en 1881, jusqu'au présent.

Jusqu'en 1889, nombre de mes recherches portaient sur l'étude des *Saccharomyces*, admis que chez eux, comme chez d'autres organismes, il se produit des unités systématiques ayant des caractères constants. Puis mes études expérimentales de la variation sont arrivées de plus en plus au premier plan, et ce sont leurs résultats que j'ai publiés successivement dans les communications suivantes:

Ueber die in dem Schleimflusse lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen. (Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. V, 664 (1889)).

Production de variétés chez les *Saccharomyces*. (Ann. de Micrographie II, 214 (1890)).

Experimental studies on the variation of yeast-cells. (Ann. of Botany. IX, 549 (1895)).

Enfin, deux conférences faites aux assemblées des brasseurs tenues en 1896 à Copenhague (Forhandlingerne paa det tredie danske Bryggerimøde) et en 1897 à Stockholm (Svenska Bryggarefören. Månadsblad).

Mes recherches sur les sujets en question se trouvent donc disséminées dans diverses publications et, comme elles couvrent un laps de temps considérable, les observations et les résultats qui devraient figurer ensemble, sont séparés. Dans le paragraphe suivant je me propose de donner un résumé succinct de ces travaux et de réunir les éléments concordants; j'y joins en outre de nouvelles recherches que j'ai eu l'occasion de faire depuis les dernières publications. Dans la plupart des points ce sera plus que la somme des résultats de mes recherches sur ce terrain: ce sera la conclusion. Les recherches du paragraphe en question comprennent les questions suivantes: forme des cellules, formation des spores et bourgeonnement, ainsi que les actions chimiques et enfin la variation de la levure de brasserie. Quand les recherches susdites se trouvent dans le „Compte rendu du Laboratoire de Carlsberg“, ce périodique est cité; mais, s'agit-il des communications provisoires dont on a parlé plus haut, on se contente d'en indiquer la date entre parenthèses.

Le troisième paragraphe communique mes nouvelles recherches sur les variétés sans spores. La fin de mes recherches sur la variation sera ultérieurement communiquée dans un ou deux nouveaux

mémoires. MM. Nielsen, Klöcker et Schiønning, attachés au Laboratoire, m'ont prêté leur concours pour faire les analyses.

2. Aperçu de mes premières recherches et nouveaux contingents à ces études.

Forme des cellules.

Le point de départ des recherches sur la variation doit naturellement être une culture absolument pure, basée sur une cellule unique. Toutefois, même dans une pareille culture, le microscope révèle immédiatement à l'observateur la diversité des individus. Telle cellule ne ressemble pas à telle autre. On peut même en dire autant des espèces qui, comme le *Saccharomyces cerevisiæ* I, présentent les individus les plus uniformes. Le type de la cellule du *Saccharomyces* peut se modifier depuis la forme de sphère parfaite jusqu'à celle de l'ovale, jusqu'à la forme d'un œuf plus ou moins en pointe, d'un boudin allongé ou d'un simulacre de bactérie. La cellule peut se ramifier et affecter les formes les plus baroques. Ces formes peuvent prendre différentes dimensions et se retrouvent dans toutes les espèces; chaque individu peut fonder une végétation, composée de tous les types susdits. (Touchant l'importance de ces observations pour la description des espèces, voir Compte rendu du Laborat. Carlsberg II, pp. 37 et 44 (1883)).

Dans le mémoire cité, j'ai également fait ressortir la variation au point de vue des formes, dimensions et nombre des spores dans la cellule mère. Hormis les espèces comme le *Sacch. anomalus*, dont les spores sont en forme de chapeau ou d'hémisphère, les espèces figurent en général à spores sphériques; c'est là la forme typique; mais il n'est pas rare qu'elle passe à celle de rognon ou d'œuf; le *Sacch. membranæfaciens* est bien l'espèce qui présente la plus grande variation dans les sens précités.

Les cellules de certaines espèces ont plus de tendance que d'autres à prendre les formes allongées; c'est ce qu'on peut affirmer en particulier du groupe *Sacch. Pastorianus*. Au début de l'évolution, ce sont généralement les cellules rondes, les ovales et les grandes qui prédominent, tandis que les phases ultérieures abondent surtout en cellules allongées et en petites. Chez le *Sacch. apiculatus* j'ai observé (Compte rendu du Laborat. Carlsberg I, 172 (1881)) que les cellules citriformes se produisent surtout au commencement du bourgeonnement, et prennent alors le dessus. Dans les cultures à l'eau et à la gélatine qui ont vieilli, il n'est pas rare de trouver de petites cellules ressemblant à des bactéries, ainsi que des cellules d'un

type différent et anormal. On constate ces faits, non seulement chez cette levure, mais encore dans d'autres espèces.

Comme on peut s'y attendre, les spores affaiblies ou celles qui germent dans des conditions alimentaires difficiles, ne donnent non plus que des cellules généralement petites. En pareils cas il se peut qu'on ait des végétations tout à fait différentes des normales. Quant à la variation due à la fusion des spores, voir les figures du Compte rendu du Laborat. Carlsberg III, 48 et suiv. (1891).

La grande différence entre les cellules ordinaires de levure de dépôt données par une espèce et ses cellules de voiles, se constate dans les figures insérées à ce Compte rendu de 1886. Dans les vieux voiles résultant d'une longue culture en ballons chargés de moût,

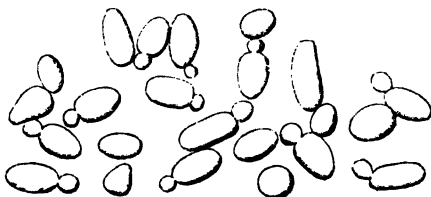


Fig 1. Sacch. Marxianus.

Levure de dépôt d'une culture d'un jour dans le moût de bière à env. 25° C.
Grossissement linéaire de 1000 fois.

la formation de colonies à cellules allongées devient très apparente. Cela est vrai de toutes les espèces, même de celles qui, comme le *Sacch. cerevisiæ* I, se distinguent, à leurs premières phases d'évolution, par la formation de cellules rondes et ovales. Les *Saccharomyces* peuvent également présenter, dans les cultures sur gélatines nourricières, des colonies à cellules allongées, ce qui leur donne fréquemment l'aspect du *Monilia candida* (Compte rendu du Laborat. Carlsberg II, 154, fig. 6 (1888)) et celui de certains degrés d'évolution des *Dematium*, *Chalara* et *Oïdium*. Les *Sacch. Marxianus*, *Sacch. membranæfaciens* et *Sacch. Ludwigii* appartiennent aux espèces qui ont une propension à cette formation. J'en ai donné une description dans le Compte rendu du Laborat. Carlsberg II, 145 et suiv. (1888) et dans le mémoire précité de 1889. Les illustrations suivantes sont nouvelles. La fig. 1 montre une jeune végétation du *Sacch. Marxianus* provenant d'une culture en moût. En la semant dans la gélatine d'eau de levure, on obtint une végétation comme celle de la fig. 2. Une pareille évolution eut également lieu sur gélatine de bière basse de garde. Les deux figures

susdites résultent de photographies prises par M. Schiønning. La formation mycélienne chez le *Sacch. Ludwigii* dans les vieilles cultures se voit en fig. 3. Même dans la germination des vieilles



Fig. 2. *Sacch. Marxianus*.

Végétation dans la gélatine d'eau de levure. Culture en chambre Boëtcher, sous ventilation abondante; température ordinaire. Grossissement linéaire de 1000 fois.

spores, on peut avoir des formations mycéliennes à cloisons transversales (voir mon illustration dans le *Compte rendu du Laborat. Carlsberg III*, 56 (1891)). Si l'on transporte dans du moût ces

végétations ressemblant à des Moisissures, il s'y développe des cellules qui peu à peu retournent au point de départ.

En général il subsiste une certaine relation numérique entre les

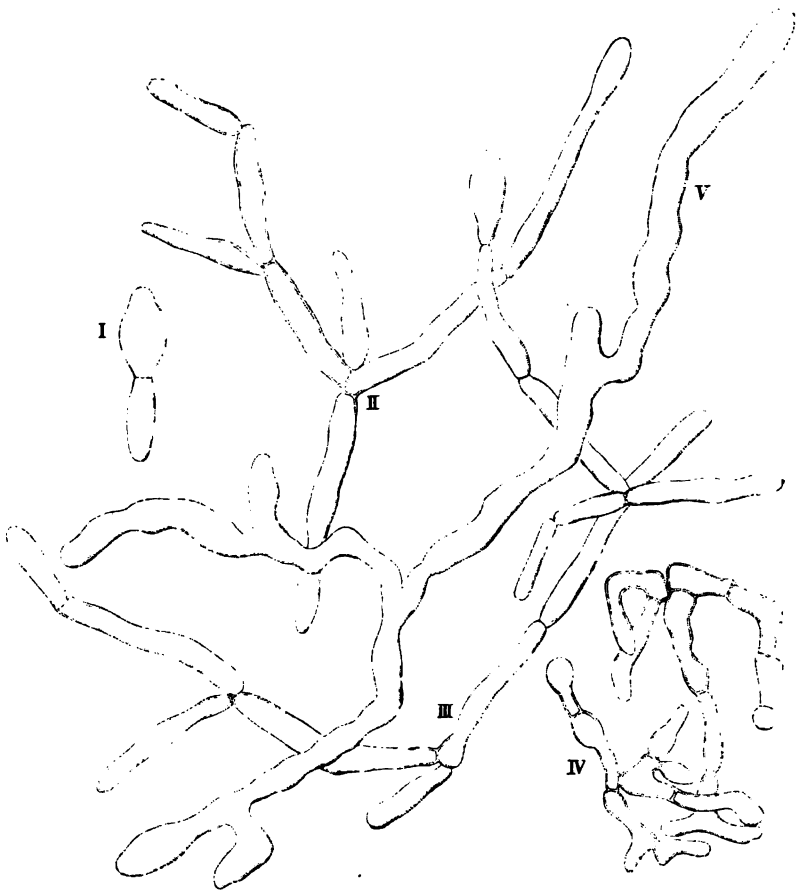


Fig. 3. *Sacch. Ludwigii*.

Formation mycélienne provenant de vieilles cultures dans du jus de cerises et dans l'eau de levure. I. Cellule de levure qui a poussé un bourgeon en boudin, séparé de la cellule mère par une cloison transversale. II—IV. Mycélium ramifié à cloisons transversales très développées. V. Cellule mycélienne à ramifications, mais sans cloison transversale. Grossissement linéaire de 1000 fois.

cellules ovales d'une espèce et celles en forme de boudin; chez les espèces appartenant aux groupes *Sacch. cerevisiæ* et *Sacch. ellipsoideus*, ce sont, comme on le sait, les ovales qui prédominent, tandis que les boudins ont le dessus dans les espèces du groupe

Sacch. Pastorianus. C'est là la règle, mais on n'en constate pas moins, en certains cas, que tel type déterminé peut persister à paraître durant plusieurs générations et plus fortement qu'à l'ordinaire, en sorte que les végétations nouvellement formées en reçoivent un cachet complètement étranger. C'est un cas de ce genre que j'ai décrit dans mes Recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation (Compte rendu du Laborat. Carlsberg II, 189 (1888)).

Les expériences auxquelles je fais allusion, ont été commencées avec de la levure basse n° 1 de Carlsberg et plus tard continuées avec d'autres espèces de levure basse de brasserie. En isolant les cellules dans une seule et même culture pure, j'ai constaté que j'obtenais deux catégories de végétations ayant chacune son type cellulaire saillant: dans l'une c'étaient les cellules ovales qui prédominaient, dans l'autre

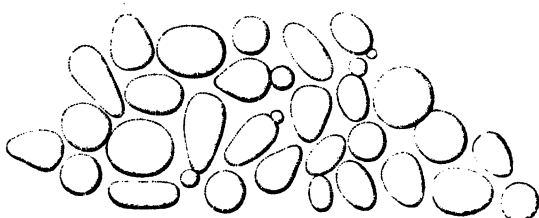


Fig. 4. Levure basse n° 1 de Carlsberg.

Levure de dépôt d'un jour en moût de bière à env. 25° C. Grossissement linéaire de 1000 fois.

celles en boudin. Cette dernière végétation avait donc un aspect tout à fait différent de celui qu'on trouve ordinairement à une végétation normale de l'espèce mentionnée. Ici, l'évolution avait suivi une ligne décidément anormale, qui se maintint durant plusieurs cultures en moût; dans un cas, il se passa même près de deux mois avant que les cellules normales eussent repris le dessus sur celles en boudin. Le type sans spores que j'ai récemment obtenu par la culture, mentionnée plus loin, du *Sacch. Pastorianus* II sur gélatine de moût à 25° C., s'est comporté d'une manière analogue; car les végétations qu'il émit dans les cultures en moût, ressemblaient, les unes à celles du groupe *Sacch. ellipsoideus*, les autres à celles du groupe *Sacch. Pastorianus*, et cette différence a persisté à travers un grand nombre de cultures, aussi bien à la température ordinaire qu'à 25° C.

J'ai montré par un exemple l'influence de la température sur la forme des cellules de levure basse de la bière, dans le Compte rendu



Fig. 5. Levure basse n° 1 de Carlsberg.
Végétation en culture en moût à $7^{\circ}1/2$ C., après ensemencement avec des
cellules d'une culture en solution de saccharose qui avait séjourné un an à
la température ordinaire. Grossissement linéaire de 1000 fois.

du Laboratoire de 1883, p. 42. On a constaté que, cultivées
dans le moût à 27° et à $7^{\circ}1/2$ C., des végétations qui avaient séjourné

pendant un an dans une solution de saccharose et dans le moût, donnaient de nouvelles végétations ayant un tout autre aspect: à 27° elles étaient généralement normales, mais à la basse température elles apparaissaient en général comme cellules allongées et colonies enchevêtrées, ressemblant à du mycélium. Plus tard, opérant sur des végétations analogues, mais un peu plus vieilles, de levure basse n° 1 de Carlsberg, j'ai obtenu au fond le même résultat. Ce qui caractérise les végétations nouvellement formées aux deux températures susdites, c'est qu'à la température inférieure les colonies évoluées sont ordinairement très ramifiées et que souvent leurs cellules sont fort allongées, tandis qu'à la température supérieure les colonies ont surtout des cellules ovales. La variation se révèle par la comparaison des figures 4 et 5, qui montrent respectivement une jeune végétation normale d'une culture en moût, et la susdite formation de colonies à 7° 1/2 C.

Toutes ces expériences ont fait constater que des cellules provenant d'une même végétation et développées dans les mêmes conditions, n'en sont pas moins aptes à donner des colonies de valeurs différentes et, par suite, à constituer diverses séries d'évolutions capables de conserver leur cachet particulier durant un certain temps. Ainsi, ce n'est point toutes les cellules qui, à basse température, développent les susdites colonies ressemblant au mycélium. Ce qu'on peut dire de tous les types anormaux ci-dessus décrits, c'est qu'après une série plus ou moins longue de cultures en moût ils reviennent à l'état normal. On doit également placer ici les recherches de Will sur la formation des voiles dans quelques espèces de levure basse de brasserie; voir la Zeitschr. f. das ges. Brauwesen, 1895.

Formation des spores et bourgeonnement.

Dans mon mémoire cité plus haut et inséré au Compte rendu du Laboratoire 1883, on trouve des renseignements sur la variation en question, non seulement en ce qui concerne la forme et les dimensions des spores, mais encore à l'égard de leur évolution. L'observation me révéla alors que les cellules du Sacch. Pastorianus I, engendrées à 27° C. dans une culture en moût ayant deux jours, avaient moins de tendance à donner des spores que les cellules de cultures d'un jour. Plus tard, l'expérience a montré que cette différence est manifeste surtout quand les cellules comparées proviennent de cultures vieilles d'un jour et de sept.

Mes diverses communications sur la levure basse n° 1 de Carlsberg font voir que nous avons ici une forme donnant extrêmement peu ou point de spores: durant la longue suite d'années pendant

laquelle cette espèce a été soumise à des recherches, elle s'est maintenue dans le susdit état, et n'a présenté que de petites oscillations. On peut en obtenir des cultures pures dont les cellules peuvent traverser de très nombreuses générations et un laps de temps fort long sans donner de spores; c'est cette forme qui pour la première fois a appelé mon attention sur la propriété qu'ont les *Saccharomyces* de perdre leur faculté de développer des spores. Elle fournit donc un nouvel exemple de l'état de choses dans lequel des individus appartenant à une même végétation et descendant, au début, de la même culture d'une cellule unique, n'en peuvent pas moins fonder différentes variétés douées d'une grande constance. Ce point est devenu plus saillant, d'une manière encore plus manifeste, par mes recherches sur le *Sacch. Ludwigii* (1889), qui montrent qu'après avoir passé quelque temps dans son milieu nutritif, cette espèce peut développer des cellules privées du pouvoir de former les susdits corps de reproduction. En isolant un assez grand nombre de cellules, j'ai obtenu trois types de végétations, dont un se distinguait par l'énergie de sa faculté de produire des spores, tandis que ce même pouvoir allait s'éteignant dans le second, et ne se manifestait nullement chez le troisième. Une culture en moût vit cette dernière végétation persister à ne donner aucune spore durant de très nombreuses générations; elle dut séjourner longtemps dans ce liquide pour que la propriété de produire des spores reparût; encore était-ce peu de chose. Au contraire, cette réapparition se manifesta promptement quand on fit la culture dans du moût additionné d'un peu de dextrose. Plus tard M. Klöcker a trouvé que le *Sacch. Marxianus* donne quelque chose d'analogue, mais de nouvelles expériences m'ont appris que ce ne sont pas toutes les variétés asporogènes du *Sacch. Ludwigii* qui réagissent de la manière décrite en présence de la dextrose. Cela nous donne un exemple d'une variation qui suscite des formes encore plus constantes que les précitées. Mes expériences ultérieures ont établi que, dans les circonstances mentionnées, d'autres espèces peuvent, elles aussi, donner des variétés asporogènes et se maintenant constantes à travers nombre de générations. Je l'ai constaté aussi bien dans les vieilles cultures en moût que dans les nouvelles, à la température ordinaire, quand il s'agit des *Sacch. cerevisiæ* I, *Sacch. Pastorianus* I, *Sacch. Pastorianus* II, *Sacch. Pastorianus* III, *Sacch. ellipsoideus* I et quelques espèces de levure basse de bière non encore décrites. En certains cas, ces cultures étaient exposées à la lumière; en d'autres, elles étaient tenues à l'obscurité; la distribution de la lumière semble donc n'avoir aucune influence; en somme, nous n'en savons pas davantage sur les conditions dans lesquelles la variation s'est produite

ici. On peut en dire autant de la variation correspondante qu'on retrouve en plusieurs espèces cultivées sur gélatine au moût. Durant ces dernières années, MM. Boullanger, P. Lindner et Beijerinck ont fait des observations analogues.

Dans le susdit mémoire de 1889, j'ai également parlé des expériences où pour la première fois j'ai réussi à produire des variétés constantes. C'est alors, en effet, que j'ai découvert la perte complète subie par la végétation des *Saccharomyces* de produire des spores lorsque, à travers de nombreuses générations, on continue à les cultiver en moût à une température voisine du maximum du bourgeonnement. En poursuivant ces expériences, je me suis convaincu qu'il y a là une loi valide pour tous les *Saccharomyces* typiques, soit espèces de levure de culture, soit espèces de levure sauvage. Les seules qui semblent y faire exception, sont les espèces à part: le *Sacch. membranefaciens*, le *Sacch. anomalus* et le *Sacch. Ludwigii*; mais il faut bien dire aussi, comme je l'ai fait ressortir ailleurs, que ces types diffèrent des espèces de *Saccharomyces* proprement dites, au point qu'on peut les donner comme types de nouveaux genres. Comme on le verra au paragraphe suivant, le *Sacch. anomalus* a donné, par un autre procédé, une variété constante dépourvue de spores.

Elle aussi, la fonction du bourgeonnement subit, comme on pouvait s'y attendre, l'influence du traitement radical qui atteint les cellules durant les susdites expériences de variation à hautes températures. Chez certaines variétés asporogènes j'ai constaté que, dans les cultures en moût, les cellules faisaient preuve d'un plus grand pouvoir de multiplication que leur type primitif, et qu'en plusieurs cas leurs végétations sur gélatine nourricière avaient un tout autre aspect que ce type. Les premières variétés sans spores que j'ai produites à la suite de la culture susdite dans des liquides à haute température, étaient toutes sans voiles, et se sont montrées aussi constantes sous ce rapport que sous le premier. Toutefois, durant ces dernières années, j'ai noté, de temps à autre, des variétés sans spores et en tout cas douées d'une grande constance, mais qui néanmoins formaient des voiles. Je les ai observées dans toutes les conditions de culture où la variation susdite a été constatée; mais le nombre était petit, et c'était pure exception. Néanmoins, dans quelques-unes de ces cultures, on a constaté que certaines cellules avaient la faculté latente et très faible de produire des spores; car au bout d'un ou de deux ans de culture, elles avaient récupéré le pouvoir de former les susdits corps de reproduction, bien que le plus souvent à un faible degré seulement. Je ne regarde donc pas comme

laquelle cette espèce a été soumise à des recherches, elle s'est maintenue dans le susdit état, et n'a présenté que de petites oscillations. On peut en obtenir des cultures pures dont les cellules peuvent traverser de très nombreuses générations et un laps de temps fort long sans donner de spores; c'est cette forme qui pour la première fois a appelé mon attention sur la propriété qu'ont les *Saccharomyces* de perdre leur faculté de développer des spores. Elle fournit donc un nouvel exemple de l'état de choses dans lequel des individus appartenant à une même végétation et descendant, au début, de la même culture d'une cellule unique, n'en peuvent pas moins fonder différentes variétés douées d'une grande constance. Ce point est devenu plus saillant, d'une manière encore plus manifeste, par mes recherches sur le *Sacch. Ludwigii* (1889), qui montrent qu'après avoir passé quelque temps dans son milieu nutritif, cette espèce peut développer des cellules privées du pouvoir de former les susdits corps de reproduction. En isolant un assez grand nombre de cellules, j'ai obtenu trois types de végétations, dont un se distinguait par l'énergie de sa faculté de produire des spores, tandis que ce même pouvoir allait s'éteignant dans le second, et ne se manifestait nullement chez le troisième. Une culture en moût vit cette dernière végétation persister à ne donner aucune spore durant de très nombreuses générations; elle dut séjourner longtemps dans ce liquide pour que la propriété de produire des spores reparût; encore était-ce peu de chose. Au contraire, cette réapparition se manifesta promptement quand on fit la culture dans du moût additionné d'un peu de dextrose. Plus tard M. Klöcker a trouvé que le *Sacch. Marxianus* donne quelque chose d'analogue, mais de nouvelles expériences m'ont appris que ce ne sont pas toutes les variétés asporogènes du *Sacch. Ludwigii* qui réagissent de la manière décrite en présence de la dextrose. Cela nous donne un exemple d'une variation qui suscite des formes encore plus constantes que les précitées. Mes expériences ultérieures ont établi que, dans les circonstances mentionnées, d'autres espèces peuvent, elles aussi, donner des variétés asporogènes et se maintenant constantes à travers nombre de générations. Je l'ai constaté aussi bien dans les vieilles cultures en moût que dans les nouvelles, à la température ordinaire, quand il s'agit des *Sacch. cerevisiae* I, *Sacch. Pastorianus* I, *Sacch. Pastorianus* II, *Sacch. Pastorianus* III, *Sacch. ellipsoideus* I et quelques espèces de levure basse de bière non encore décrites. En certains cas, ces cultures étaient exposées à la lumière; en d'autres, elles étaient tenues à l'obscurité: la distribution de la lumière semble donc n'avoir aucune influence: en somme, nous n'en savons pas davantage sur les conditions dans lesquelles la variation s'est produite

ici. On peut en dire autant de la variation correspondante qu'on retrouve en plusieurs espèces cultivées sur gélatine au moût. Durant ces dernières années, MM. Boullanger, P. Lindner et Beijerinck ont fait des observations analogues.

Dans le susdit mémoire de 1889, j'ai également parlé des expériences où pour la première fois j'ai réussi à produire des variétés constantes. C'est alors, en effet, que j'ai découvert la perte complète subie par la végétation des *Saccharomyces* de produire des spores lorsque, à travers de nombreuses générations, on continue à les cultiver en moût à une température voisine du maximum du bourgeonnement. En poursuivant ces expériences, je me suis convaincu qu'il y a là une loi valide pour tous les *Saccharomyces* typiques, soit espèces de levure de culture, soit espèces de levure sauvage. Les seules qui semblent y faire exception, sont les espèces à part: le *Sacch. membranæfaciens*, le *Sacch. anomalus* et le *Sacch. Ludwigii*; mais il faut bien dire aussi, comme je l'ai fait ressortir ailleurs, que ces types diffèrent des espèces de *Saccharomyces* proprement dites, au point qu'on peut les donner comme types de nouveaux genres. Comme on le verra au paragraphe suivant, le *Sacch. anomalus* a donné, par un autre procédé, une variété constante dépourvue de spores.

Elle aussi, la fonction du bourgeonnement subit, comme on pouvait s'y attendre, l'influence du traitement radical qui atteint les cellules durant les susdites expériences de variation à hautes températures. Chez certaines variétés asporogènes j'ai constaté que, dans les cultures en moût, les cellules faisaient preuve d'un plus grand pouvoir de multiplication que leur type primitif, et qu'en plusieurs cas leurs végétations sur gélatine nourricière avaient un tout autre aspect que ce type. Les premières variétés sans spores que j'ai produites à la suite de la culture susdite dans des liquides à haute température, étaient toutes sans voiles, et se sont montrées aussi constantes sous ce rapport que sous le premier. Toutefois, durant ces dernières années, j'ai noté, de temps à autre, des variétés sans spores et en tout cas douées d'une grande constance, mais qui néanmoins formaient des voiles. Je les ai observées dans toutes les conditions de culture où la variation susdite a été constatée; mais le nombre était petit, et c'était pure exception. Néanmoins, dans quelques-unes de ces cultures, on a constaté que certaines cellules avaient la faculté latente et très faible de produire des spores; car au bout d'un ou de deux ans de culture, elles avaient récupéré le pouvoir de former les susdits corps de reproduction, bien que le plus souvent à un faible degré seulement. Je ne regarde donc pas comme

invraisemblable que ces variétés asporogènes qui produisent des voiles, reviendront toutes à l'état normal et que, par conséquent, elles diffèrent des autres pour la valeur. Je les ai observées dans le *Sacch. cerevisiæ* I, le *Sacch. Pastorianus* II, le *Johannisberg* II et la levure de distillerie dite Rasse II de Lindner. Or, quelle que soit l'explication de ce qui se passe, le fait général est que la perte du pouvoir de donner des spores et la perte de celui de former des voiles ont lieu ensemble durant le traitement décrit.

Au moment où paraît ce mémoire, les plus anciennes de mes variétés sans spores vont dater de douze ans; nombre d'entre elles remontent à trois ans et plus. Bien que durant cette longue période de temps elles aient été cultivées dans les conditions les plus diverses, elles n'ont rien perdu en constance: ces vieilles cultures n'ont redonné ni spores ni voiles.

Dans le Compte rendu du Laborat. Carlsberg II, 119 (1886) j'ai mentionné la variation frappante constatée dans la manière dont la levure de dépôt se peut comporter dans les cultures en moût. La plupart des espèces présentent généralement cette levure sous une apparence pâteuse; mais parfois elle paraît disposée en couches membraneuses et plissées, ou bien l'aspect est caséux: souvent il y a des fragments noueux et creux. Dans ces cas-là, il se forme, pendant le bourgeonnement, des colonies fortement ramifiées dont les cellules ne se séparent pas les unes des autres, et le liquide se maintient d'un blanc éclatant, même après que la fermentation est en pleine activité. J'ai observé ce phénomène dans mes trois espèces du groupe *Sacch. Pastorianus*, quand je pris la semence dans de vieilles cultures en solution de saccharose ou en moût. Ce qui précède était publié quand je remarquai qu'après être restées desséchées pendant un certain temps, ces espèces, aussi bien que la levure basse n° 2 de Carlsberg et *Johannisberg* II, pouvaient également développer dans le moût de la levure caséuse. Ces cas ont tous cela de commun que les cellules de la semence sont plus ou moins affaiblies. Cependant l'évolution anormale qu'on a décrite, ne se produit pas toujours dans les circonstances indiquées; les facteurs qui en décident, nous sont inconnues. Parfois elle traverse une longue série de cultures; souvent elle est promptement remplacée par le type commun de la levure pâteuse. On retrouve cette même fugacité et cette même irrégularité de caractère dans la variation qui consiste en ce que la levure basse peut présenter, durant un certain temps, les phénomènes constatés en cas de levure haute, et inversement.

Actions chimiques. Variations de la levure de brasserie.

Dans la communication de 1895 citée plus haut, j'ai mentionné quelques recherches qui visent à obtenir des variétés donnant lieu à plus ou moins d'alcool que leurs types primitifs. En cultivant deux variétés de levure basse n° 1 de Carlsberg en deux séries, l'une en moût ordinaire, l'autre à la surface de la gélatine au moût, et renouvelant fréquemment ces cultures, j'ai constaté qu'au bout de quelques mois il s'était produit, sur la gélatine au moût, des variétés qui surpassaient, en pouvoir fermentaire vis-à-vis de la production de l'alcool, les types dont elles provenaient et qui avaient été constamment cultivés dans le moût. Dans le moût de bière additionné de 25 p. c. de sucre de canne et à la température ordinaire, les types primitifs produisirent environ 13 vol. p. c. d'alcool, tandis que les variétés nouvelles en donnèrent 13,6. Une différence encore plus grande et dans le même sens s'est manifestée dans quelques expériences que je fis avec une espèce de levure haute, savoir le *Sacch. cerevisiæ* I, et que je conduisis comme les précédentes, en remplaçant seulement la gélatine au moût par la gélatine d'eau de levure sur laquelle furent semées des spores. Il se développa alors sur la gélatine une végétation qui donna de 1 à 3 vol. p. c. d'alcool de plus que la végétation correspondante, constamment cultivée en moût de bière. Plus tard, ces expériences furent répétées plusieurs fois et, bien que de temps à autre j'observasse des oscillations notables, dans la plupart des cas les végétations engendrées sur lesdites gélatines nourricières produisirent plus d'alcool que les végétations du moût. Autant que je puis actuellement pénétrer cet état de choses, je suis forcé d'admettre qu'il y a eu des particularités de race chez les individus employés au début des expériences et que le phénomène principal de la culture sur les gélatines est une sélection et non une transformation. Comme j'ai eu auparavant l'occasion de le faire ressortir, il y a une grande différence de pouvoir fermentaire chez les individus d'une seule et même culture pure; mais en général ces variétés n'ont qu'un caractère très fugace.

Ce cercle de recherches comprend encore et surtout celles que M. Biernacki a publiées en 1887 concernant l'action des antiseptiques et qui ont fait constater que, dans certaines conditions, de petites doses produisent une végétation douée d'un pouvoir fermentaire vis-à-vis de la production de l'alcool, pouvoir qui est plus grand qu'au début. Plus tard, MM. Märcker et Hayduck arrivèrent au même résultat, et récemment M. Effront aussi, comme on le sait. L'état de cette question n'a été ni approfondi ni expliqué.

Une autre série de mes recherches visait à affaiblir le pouvoir

fermentaire. On constata que, si la levure basse n° 1 de Carlsberg est cultivée en moût de bière à 32° C. durant huit cultures et de manière à inoculer chaque culture de sa précédente et à la laisser ensuite reposer jusqu'à ce que la fermentation cesse, et par conséquent sans aération particulière, on obtient alors une végétation donnant jusqu'à 2 vol. p. c. d'alcool de moins que la végétation par laquelle les expériences ont commencé. La fermentation eut lieu dans du moût marquant 14 p. c. Ball. avec addition de 10 p. c. de saccharose. Traitée de la même manière, la levure basse n° 2 de Carlsberg donna un résultat analogue.

Durant plusieurs années j'ai donné à quelques-unes des espèces de *Saccharomyces* décrites par moi une culture qui les empêchait de causer la fermentation alcoolique. Le point de départ était, soit des spores, soit des cellules végétatives ordinaires, soit des cellules des voiles. Les ancêtres de ces dernières avaient commencé à vivre il y avait sept ans à la surface du liquide, sous l'influence directe de l'air. En tout cas, pendant un immense nombre de générations, les végétations traitées n'avaient nullement fait preuve d'activité de pouvoir fermentaire vis-à-vis de la production de l'alcool; néanmoins elles persistèrent à produire de l'alcool, et avec une vigueur qui ne semblait pas affaiblie. Il en fut de même de la production de spores et de la formation d'invertase et de maltase. En somme, il a été impossible d'amener les cellules à ne plus développer les susdits enzymes. Nous pouvons bien causer un affaiblissement temporaire, mais rien au delà. S'agit-il, au contraire, de bactéries, on sait combien il est commun d'observer que durant la culture en laboratoire elles perdent complètement leur pouvoir fermentaire. Et inversement il n'a pas non plus été possible de transformer le plasma de la cellule du *Saccharomyces* de manière à susciter en lui une nouvelle productivité d'enzymes dont il n'était pas doué préalablement. En dépit de toutes les expériences faites, soit dans notre Laboratoire, soit ailleurs, les espèces telles que le *Sacch. apiculatus* refusent constamment d'intervertir et de faire fermenter les solutions de saccharose, et les espèces comme le *Sacch. Marxianus* et le *Sacch. Ludwigii* prennent la même attitude en face de la maltose. Voir aussi le mémoire de M. Klöcker dans la présente livraison.

A la série de variations qu'on vient de mentionner, se rattache également la suivante. Le *Sacch. Pastorianus* 1 est, on se le rappelle, une levure de maladie communiquant à la bière une odeur désagréable et un goût amer. D'après les recherches de MM. Mach et Portele, ce *Saccharomyces* n'en donne pas moins un bon vin. et mes recherches ont établi que, cultivé à 32° C., à travers de

nombreuses générations dans une solution de sucre de canne (10 p. c.) dans de l'eau de levure, de *Saccharomyces* forme des cellules qui pendant un certain temps ont perdu les susdites propriétés délétères pour la fermentation de la bière. Toutefois une culture prolongée dans le moût de bière ramène promptement la végétation à son point de départ.

L'accommodabilité des cellules de cette espèce a été mentionnée en plusieurs endroits de mes divers mémoires. Ainsi, dans mes expériences sur les levures de maladie (Compte rendu du Laborat. Carlsberg II, 55 (1883) et III, 146 et 150 (1892)) j'ai également fait ressortir la relation intéressante en vertu de laquelle ces espèces ne causent les maladies que par infection au début de la fermentation principale; mais si cette infection n'a lieu que vers la fin de cette fermentation ou durant le temps de garde, elles sont incapables de produire leur effet dans les conditions ordinaires de la brasserie.

Dans une de mes recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation (Unters. aus der Praxis der Gärungsindustrie, zweites Heft (1892)) j'ai parlé de l'importance qu'a l'aération du moût avant qu'on y ajoute la levure. En cultivant à part dans du moût aéré les levures basses n^{os} 1 et 2 de Carlsberg, j'ai obtenu un levain qui, dans les conditions de brasserie, donna une bonne clarification normale. Si, au contraire, ces deux mêmes espèces de levures étaient cultivées dans un moût tout à fait pareil, mais non aéré, les végétations de levure résultantes avaient besoin de subir plusieurs fermentations en moût aéré avant de pouvoir fonctionner de la manière normale. La bière qu'elles produisaient avait surtout le défaut d'opaliser et d'être trouble. Cependant la levure n^o 2 revenait plus promptement à son état primitif que la levure n^o 1. Telle est la règle, mais, par exception, j'ai observé que le moût peut avoir une composition rendant superflue l'aération.

C'est ici le lieu le plus convenable pour mentionner la variation des espèces de levures de bière durant l'exploitation. Les communications qui suivent sont en substance l'extrait d'une conférence que j'ai faite aux étudiants de notre Laboratoire il y a deux ans (et traduite, en 1898, par M. Bělohoubek dans le *Casopis pro prumysl chemicky*, 1898). Il va de soi que les espèces de levures de bière peuvent varier autant en bien qu'en mal; nous mentionnerons brièvement ces deux faces. Comme on le sait, le système des cultures pures comprend un choix fait méthodiquement tant des espèces que des races. La question est de choisir les individus les mieux adaptés, c'est-à-dire ceux qui fondent une végétation ayant les propriétés désirées. Cela a naturellement entraîné les techniciens à chercher l'amélioration des races par une sélection. Les individus appartenant à une

seule et même race et ayant pour souche une seule et même culture provenant d'une cellule unique peuvent, ainsi qu'on l'a montré précédemment, fonder des variétés qui divergent manifestement et qui restent plus ou moins constantes, points qui seront éclaircis de plus près dans les expériences suivantes. Durant les premières années, après que j'eus introduit la nouvelle réforme dans la fermentation, je donnai la nouvelle direction à mes propres travaux dans les brasseries du Vieux et du Nouveau Carlsberg, m'occupant surtout des deux espèces de levure basse n° 1 et n° 2 fréquemment citées. Il en résulta des races qui à certains égards étaient meilleures que celles avec lesquelles j'avais débuté en 1883. Au point de vue botanique, elles concordaient bien avec celles de mon point de départ; mais, aux yeux du brasseur, elles différaient pourtant un peu. En plusieurs endroits de mes écrits j'ai fait de petites communications en ce sens. On a également fait de pareils essais dans la plupart des laboratoires de brasserie. Nous n'avons pas ici de règles applicables à tout; en somme, il faut tâtonner, et les races produites de cette manière ne persistent généralement pas, mais se perdent.

Il en est autrement des variétés que j'ai produites en pratiquant la culture à une température élevée: elles ont persisté durant l'exploitation et peuvent être obtenues à volonté; car ici nous pouvons procéder d'après une méthode certaine. La variété nouvelle, mentionnée page 14, de levure basse n° 1 de Carlsberg a donné, dans les conditions de la brasserie, une clarification un peu meilleure et une moindre atténuation sur la fin de la fermentation principale que son type d'origine, et elle s'est maintenue à ce niveau pendant plusieurs cultures pratiquées à la brasserie et qui absorbèrent quelques mois. Dans le sens considéré, elle peut bien être regardée comme représentant un progrès; mais on n'ose pas l'introduire dans l'exploitation, car elle continue à n'opérer que trop lentement. J'ai eu de meilleurs résultats de la variété asporogène de la levure basse n° 2 de Carlsberg produite par la culture susmentionnée en moût aéré à haute température et en renouvelant fréquemment le liquide. La première communication relative aux essais de brassage faits avec cette variété se trouve dans la susdite communication provisoire de 1890. Les caractères nouveaux de cette variété se sont produits, au fond, dans le même sens que pour la précédente, mais sans que j'aie observé des difficultés dans l'exploitation. A diverses époques on a fait des séries d'essais à la brasserie du Vieux Carlsberg dans le caves de fermentation et en se servant de petites cuves contenant chacune un hectolitre et un tiers de moût. La bière brassée avec cette variété était excellente; en général elle avait un goût plus riche et se clarifiait ordinaire-

ment mieux que celle de son type primitif; mais elle se conservait moins bien en bouteilles, car il s'y formait plus rapidement un précipité de levure. En tout cas, ces essais ont jalonné une voie pour arriver à obtenir de nouvelles variétés douées des principales propriétés susdites, probablement de la plupart des espèces de levures basses et, peut-être, de toutes. L'emploi d'une variété sans spores dans les brasseries met naturellement à même d'effectuer avec plus d'aisance et de sûreté qu'autrement l'analyse du levain quant à la levure sauvage.

On se souviendra qu'au début de son emploi dans l'exploitation, la levure de culture pure peut susciter des difficultés surtout pour la clarification et l'atténuation, plus rarement sous le rapport du goût. Durant les premières années qui suivirent l'introduction du système de culture pure, les inconvénients de cette variation furent l'objet de fréquentes discussions dans les journaux techniques, et servirent d'armes pour attaquer mes tentatives. Et pourtant il s'en faut que toutes les espèces et races donnent du mal, et les difficultés qui quelquefois surgissent ne durent que peu dans la plupart des cas; la levure produite dans les conditions qu'offre le laboratoire s'est donc alors accommodée aux conditions de brasserie, et fonctionne de la manière désirée. Il va de soi que dans l'exploitation même il peut se présenter des circonstances ayant pour effet qu'une espèce de levure qui jusqu'alors avait fonctionné d'une manière satisfaisante, commence à varier dans un sens fâcheux. Des oscillations mal à propos dans la composition du moût et le manque de propreté jouent ici un rôle important. L'emploi des cuves de bois est surtout défavorable à la fermentation, si l'on ne veille pas à en tenir la surface lisse et vernie. Quand le bois s'effile, les cellules de levure peuvent, durant nombre de générations, se multiplier dans des conditions qui s'écartent tout à fait de l'état normal. La même chose peut avoir lieu dans les conduits et surtout dans leurs joints. J'ai poursuivi durant des années mes recherches sur la variation dans l'exploitation. Voici comment je m'exprimais sur le résultat de cette étude, dans le *Compte rendu du Laborat. Carlsb. III*, 144 (1892): „Tant que les espèces de levure de bière sont exposées aux influences de la brasserie, elles ne subissent que de faibles variations qui sont de nature passagère. Considérées au point de vue biologique, ces variations nous portent plutôt à les déclarer tout à fait insignifiantes, tandis que, aux yeux du brasseur praticien, la chose se présente d'une autre manière. En effet, ces transformations peuvent se manifester d'une manière désagréable et parfois causer une perturbation sensible. Durant le cours de l'année, elles forment une ondulation dans le flot de l'exploitation;

quant à la cause propre, nous n'en avons pas même l'idée dans la plupart des cas." C'est là qu'on en est jusqu'à nouvel ordre.

Les journaux techniques de ces dernières années présentent de pareilles observations dues à MM. Delbrück, Jörgensen, Kukla, Lindner, Will et autres. Les races diffèrent de tendance dans le susdit égard; mais dans tous les cas on se sert du même moyen: l'introduction d'une nouvelle culture pure.

Quant à la variation qui peut résulter de la conservation, pendant un temps assez long, des levures soit dans une solution de saccharose, soit d'une autre manière, j'ai donné quelques renseignements dans le commencement de ce chapitre, comme aussi dans mon traité inséré au Compte rendu du Laboratoire, 1898. Du reste, dans une suite à ce dernier traité, j'aurai l'occasion de donner communication de quelques nouvelles recherches faites sur ce sujet; aussi je ne m'y arrêterai pas ici.

3. Nouvelles recherches sur les variétés asporogènes.

Nous venons de voir comment la cellule de levure est soumise de tous côtés aux fluctuations de la variation; dans tous les sens, les variétés surgissent présentant tous les différents degrés de permanence. Cependant ce ne sont que les variétés sans spores qui se laissent dominer entièrement par l'expérimentateur; elles présentent les conditions les plus nettes et les moins compliquées; nulle part nous ne trouverons une telle régularité qu'ici. En outre, ces variétés avec leurs qualités différentes sont les seules que pour le moment nous puissions considérer comme constantes. C'est ce qui leur donne aussi un intérêt spécial pratique comme points de départ pour la création de nouvelles races utiles à l'industrie. C'est pourquoi j'ai toujours insisté particulièrement sur l'étude de cette variation, qui a aussi été l'objet exclusif de mes nouvelles recherches que je communiquerai par la suite. Je commencerai par l'aperçu des méthodes, que j'ai promis auparavant; ensuite je mentionnerai les détails et expériences analytiques nécessaires, puis l'examen de la question fondamentale ayant pour but de connaître si c'est une transformation ou une sélection qui a lieu. Enfin j'expliquerai les différents facteurs dont dépend le phénomène.

Méthodes.

A moins d'indication contraire, j'ai fait les expériences de la manière suivante: j'avais pour point de départ une jeune végétation vigoureuse produisant une richesse de spores; elles provenaient d'une culture en moût, de vingt-quatre heures, à 25° C. J'ai toujours em-

ployé des végétations absolument pures provenant d'une cellule unique et me suis servi, pour la culture, des ballons Pasteur à deux cols ($\frac{1}{8}$ de litre). On pourra aussi se servir d'autres matras, mais dans ce cas-là l'évolution ne se produira pas exactement de la manière ci-après décrite. Deux fois par jour on a exposé le liquide à l'action de l'air en l'agitant. De cette manière, les cellules ont été transportées dans d'autres zones de nutrition, en même temps que l'acide carbonique a été expulsé et que l'oxygénation a eu lieu. Chaque culture a séjourné 24 heures aux températures indiquées dans la description suivante des expériences, et la subséquente a été infectée par un échantillon moyen de la précédente. Aux différentes phases de l'expérience, on a prélevé des échantillons moyens, et les individus en ont été isolés pour essayer si les végétations qu'ils avaient formées étaient asporogènes ou non. Dans mes premières expériences, j'ai employé ces échantillons pour des cultures sur plaques avec de la gélatine au moût, en les mêlant comme à l'ordinaire avec la gélatine. L'apparence des colonies ne donnant aucune indication sur leurs qualités sporogènes, elles furent transportées dans de petits matras chargés de moût, et ensuite les végétations obtenues de cette manière furent essayées dans des cultures ordinaires, sur des blocs de plâtre, à 25° C. Ce procédé est très circonstancié, et, comme plus tard, on a dû examiner plusieurs centaines d'individus de chaque phase, on a essayé de le simplifier en répartissant les cellules, au moyen d'un pinceau en platine, sur la surface de gélatine au moût solide, placée dans des boîtes de Petri, et puis, en transportant les colonies qu'elles avaient formées, directement sur les blocs de plâtre. Dans ce but, la surface circulaire de ces derniers, dont le diamètre était de 3^{cm}8, fut divisée en carrés par des traits au crayon, de manière qu'on pût placer 12 colonies sur chaque bloc. Comme à l'ordinaire, ces cultures furent faites à 25° C. L'analyse eut lieu quatre ou cinq jours après. Les résultats que présente cette manière de répartir sur la gélatine figée les cellules, dans le but d'obtenir des cultures provenant chacune d'une cellule unique, sont aussi bons que ceux qui sont dus à la répartition des cellules en gélatine liquide. Comme auparavant, j'ai fait le contrôle en répartissant sur la surface de la gélatine au moût figée un mélange composé de *Sacch. apiculatus* et d'une autre espèce de levure de forme nettement différente. Le résultat fut qu'environ les 99 pour cent des colonies contenaient des cultures pures. Ici, comme à l'ordinaire, on doit s'appliquer à se servir d'échantillons moyens pour les analyses. Les colonies appartiennent ordinairement à deux catégories, les grandes et les petites colonies. Parmi ces dernières, on trouve le plus grand pour-cent de végétations asporogènes. Soit qu'on

se serve de l'une ou de l'autre forme de répartition sur plaques, le résultat sera que la faculté sporogène des cellules diminuera un peu par la culture sur ou dans la gélatine; il arrive ainsi ordinairement que quelques-unes des végétations de la gélatine au moût ne produisent pas de spores sur les blocs de plâtre, si elles sont transportées directement sur ces derniers, tandis qu'après une seule culture en moût, elles donnent une végétation qui pourra produire une richesse de spores. Cela concerne surtout les petites colonies; aussi le plus pratique sera-t-il ordinairement de transporter celles-ci immédiatement dans la culture en moût pour commencer plus tard la culture pour obtenir des spores.

Cependant ce n'est pas là que finit l'analyse. Aussi parmi les végétations engendrées en moût, il y en a qui n'ont cessé que provisoirement de produire des spores. Dans les communications précédentes sur le *Sacch. Ludwigii*, on a déjà mentionné que cette faculté peut revenir aux cellules durant une longue culture en moût. Un grand nombre des cellules qui, au commencement du traitement aux températures élevées, se montrent asporogènes, reviennent vite, dans ces circonstances, à la production des spores; dans d'autres cas, cette faculté ne leur revient que dans l'espace d'une à deux années. On trouve tous les degrés possibles; mais ce n'est qu'un très petit nombre qui, au bout d'une année, change encore de cette manière. Si dans la suite je parle de variétés constantes, cette dénomination se rapportera à celles qui ont subi ce contrôle. L'expérience a démontré qu'à cet égard la meilleure méthode est de faire séjourner la végétation dont il s'agit en moût de bière à la température ordinaire et de renouveler le liquide tous les trois ou quatre mois; ce dernier procédé est également nécessaire, si l'on veut se garantir de la mort des cellules. Sur la marche de l'analyse, voir en outre les tableaux des pages 35 et 36.

Il y a bon nombre d'années que j'ai fait une expérience d'hiémation d'une de mes variétés asporogènes. J'ai placé les cellules dans des tubes d'argile compacts chargés de terre stérilisée et que j'ai enfouis dans un jardin près du Laboratoire. Quand, quelques mois après, j'en ai prélevé un échantillon, elles étaient vivantes et produisaient des spores. Cependant en examinant de plus près la végétation ensemencée, j'ai constaté qu'elle n'appartenait pas à une variété constante, comme je le croyais à cette époque-là. La méthode de régénération par la culture en moût, ci-dessus décrite, est la seule que nous connaissions.

C'est à tort que parfois on emploie le mot régénération pour désigner ce qui se passe quand on a pour point de départ une végétation dont la plupart des cellules sont asporogènes et qu'on a produit une végétation vigoureuse sporogène en en séparant les quelques cellules

qui ont gardé cette faculté. Il va de soi que ces dernières peuvent fonder une végétation sporifique. Elles n'ont en effet jamais perdu cette faculté, mais restent ce qu'elles étaient. La même considération s'applique également, si nous prenons la spore elle-même comme point de départ. Mais il en est tout autrement des cas ci-dessus décrits, où nous nous sommes occupés de végétations qui, en ce moment-là, ne contenaient pas une seule cellule pouvant donner des spores; là, la faculté reproductive était perdue jusqu'à nouvel ordre et elle n'était revenue que par suite d'une culture prolongée en moût. Pour ne pas causer de malentendus, il faut toujours, quand on veut se servir de dénominations telles que régénération et dégénération, considérer les individus mêmes et non pas la foule complexe des cellules différentes de toute une culture.

La plupart des expériences furent faites, de la manière ci-dessus décrite, en moût de bière basse de garde ordinaire marquant 14 p. c. Ball., qui avait séjourné assez longtemps et qui s'était oxygéné de cette manière. Pour les expériences qui ont été faites dans d'autres liquides, on a spécifié ces derniers.

Une série assez considérable a été faite sur gélatine au moût composée du moût de bière susmentionné avec 8 p. c. de gélatine. Une couche épaisse était installée dans un matras Freudenberg de manière à présenter une surface oblique. Pour réduire l'évaporation et permettre en même temps l'aération et l'échappement de l'acide carbonique, on appliqua, au moyen d'un tube de caoutchouc, un petit bec en verre en S sur le tuyau du capuchon, construction semblable d'ailleurs à celle du ballon Pasteur à deux cols. Dans ce cas, on a également choisi pour point de départ de jeunes cellules vigoureuses; elles étaient placées en cultures par stries superficielles sur la gélatine à 25° C. et à la température ordinaire, sans renouvellements; chaque série ne se composait donc que d'une culture. Dans les cas peu nombreux où les expériences ont été faites d'une autre manière, on l'a mentionné dans la suite. Les analyses ont été faites d'après les méthodes ci-dessus décrites.

Expériences faites dans les liquides nutritifs.

Dans la suite, je mentionne les expériences faites avec le Sacch. *Pastorianus* I et la levure de vin *Johannisberg* II qu'ont fait connaître les expériences faites par MM. Aderhold et Wortmann.

Sacch. Pastorianus I.

En ce qui concerne cette espèce, la température maxima pour le bourgeonnement en moût de bière est d'environ 34° C., et pour la

production de spores sur bloc de plâtre d'environ 29° C. Du point de départ de la série d'expériences ci-après décrite, on a isolé 1000 cellules. Elles ont toutes formé des végétations à spores, et il était impossible de constater l'existence de cellules asporogènes dans la végétation ayant servi de point de départ à l'expérience. La température était de 32° C.

Dans la 2° culture on a trouvé 1 p. c. de cellules constamm. asporogènes.

—	.	4°	—	.	.	—	60	—	.	—	—	—
—	.	7°	—	.	.	—	100	—	.	—	—	—

Ces chiffres ne sont cités que comme exemples pris d'une série d'expériences pour donner une idée de l'évolution qui se passe. Les séries faites à différentes époques montrent, il est vrai, des oscillations sensibles à l'égard des chiffres, mais elles présentent toutes la marque caractéristique qu'au commencement il n'y a que peu de cellules asporogènes, tandis que leur nombre augmente à mesure qu'on parvient aux cultures postérieures. Après sept jours de culture dans les circonstances ci-dessus indiquées, toutes les cellules étaient ordinairement asporogènes.

Dans la végétation par laquelle la série ci-dessus a commencé, il n'y avait donc pas de cellules asporogènes, tandis que j'en ai démontré l'existence dans les points de départ de quelques-unes des autres séries que j'ai faites. Effectivement, en faisant aussi, dans chacune d'elles, une analyse de 1000 cellules, j'ai trouvé que $\frac{1}{20}$ — $\frac{1}{10}$ p. c. en étaient asporogènes.

Il n'y a que peu d'individus dont le bourgeonnement et la formation de spores aient lieu aux plus hautes températures où l'espèce exerce ces fonctions: un assez grand nombre s'arrête déjà à un degré au-dessous, et il y en a d'autres qui n'arrivent même pas à ce degré. Ici, comme pour toutes les fonctions, il existe toute une échelle: dans la physiologie, nous sommes cependant habitués à de semblables irrégularités. Toutefois, la règle sera toujours que la température exigible pour la création de la variété asporogène est entre la température maxima de la cellule en question pour la formation de spores et sa température maxima pour le bourgeonnement. Conformément à ce qui précède, on trouvera qu'on peut aussi produire la variété asporogène, si l'on emploie 28° C. au lieu de 32°. Si le traitement se fait de la manière ci-dessus décrite à la première de ces températures, la 17° culture contiendra un grand nombre de cellules asporogènes; mais bien que le traitement ait eu lieu avec tant de cultures, les cellules sporogènes auront cependant toujours le prépondérance, et même encore dans la 21° culture, on trouvera, en grand

Cette espèce fut choisie pour les expériences parce que c'est une espèce de levure sauvage qui n'a été soumise qu'assez peu de temps à la culture du laboratoire, et enfin parce que son pouvoir sporifique est beaucoup plus grand que celui de l'espèce précédente et de plusieurs autres espèces, environ 100 p. c. de ses cellules cultivées sur bloc de plâtre à 25° C. développant ces corps de reproduction. Sa température maxima pour le bourgeonnement en moût de bière est de 37° à 38° C. et, pour la formation de spores en culture sur bloc de plâtre, de 33° à 34° C. Quant à quelques-unes des séries d'expériences, j'avais pris pour point de départ une cellule végétative, pour les autres je pris une spore. Ici, on a aussi contrôlé 1000 cellules appartenant au point de départ de chaque série; mais on n'a jamais réussi à découvrir des variétés asporogènes; toutes les cellules ont fondé des végétations douées d'une formation de spores vigoureuse. A titre d'exemple de l'évolution, je citerai la série suivante faite à 36° C.

—	4 ^c	—	.	—	10	—	.	—	—	—
—	5 ^c	—	.	—	20	—	.	—	—	—

La variété asporogène se montre également, si la culture se fait à 37° C. et aux températures variant de 32° à 36° C. Toutefois, à la température de 32°—33° C., on n'a encore trouvé dans la 20^e culture que 4 p. c. de cellules constamment asporogènes, par conséquent un nombre beaucoup plus petit qu'après le traitement à 36° C. Ce qui est dit ci-dessus du *Sacch. Pastorianus* I en ce qui concerne la culture aux températures élevées et aux plus basses températures, s'applique aussi à cette espèce.

Les séries d'expériences précédentes appartiennent à celles où, ainsi qu'il a été mentionné dans la description des méthodes, on transporte un échantillon moyen d'une culture à l'autre. Cependant les expériences relatives à cette espèce ont aussi été exécutées de façon à opérer dans toutes les cultures avec toute la masse de levure et qu'à la formation de chaque nouvelle culture on n'a écarté que le liquide

couvrant la levure, lequel a été remplacé par de nouveau moût. Dans ces expériences, la 1^{re} culture séjourna en outre 3 jours à 36° C., et chacune des cultures suivantes 2 jours.

Dans la 2^e culture, on a trouvé $\frac{1}{2}$ p. c. de cellules constamm. asporogènes.

— . 4° — . . —	30 — . — — —
— . 6° — . . —	50 — . — — —
— . 13° — . . —	90 — . — — —

Ainsi qu'il est mentionné ci-dessus, j'ai fait plusieurs séries d'expériences avec chacune des espèces, mais pour les citer toutes il me faudrait donner trop d'ampleur au présent mémoire.

Expériences faites sur un milieu nutritif solide.

La méthode a été décrite page 21. Les expériences sur gélatine au moût à 25° C. ont donné les résultats suivants:

Sacch. cerevisiae I.

Au bout de 3 mois, un assez grand nombre de cellules constamment asporogènes.

Sacch. Pastorianus I.

Au bout de 1 an et 9 mois, point de cellules constamment asporogènes.

Sacch. Pastorianus II.

Au bout de 1 an et 9 mois, un assez grand nombre de cellules constamment asporogènes.

Sacch. Pastorianus III.

Au bout de 1 an et 9 mois, très peu de cellules constamment asporogènes.

Sacch. ellipsoideus I.

Au bout de 1 an et 9 mois, point de cellules constamment asporogènes.

Sacch. ellipsoideus II.

Au bout de 1 an et 9 mois, un petit nombre de cellules constamment asporogènes.

Johannisberg II.

Au bout de 1 an, très peu de cellules constamment asporogènes.

Sacch. Ludwigi.

Au bout de 1 an et 9 mois, point de cellules constamment asporogènes.

Sacch. membrancefaciens.

Au bout de 1 an et 9 mois, point de cellules constamment asporogènes.

Je n'ai donc pas constaté l'existence de la variété constamment asporogène chez toutes les espèces; mais dans les cas où je l'ai trouvée, le nombre des cellules qui la représentaient était toujours relativement peu considérable. Comme on le voit, les cellules sporogènes prédominaient aussi dans les très vieilles cultures. Chez toutes les espèces j'ai observé une variation fugace dans ce sens. De même que mes anciennes expériences relatives au *Sacch. Ludwigii*, de 1889, ces dernières ont aussi donné comme résultat qu'en isolant les individus d'une pareille végétation dans des cultures particulières, je pouvais obtenir des végétations produisant soit des spores nombreuses, soit très peu de spores, soit point de spores, et que cette dernière catégorie se conservait souvent durant plusieurs cultures avant de retrouver sa propriété sporifique.

Dans les expériences pratiquées sur la gélatine au moût et à la température ordinaire, j'ai observé la variété constamment asporogène dans le *Sacch. cerevisiæ* I au bout de 4 mois; dans le *Johannisberg II*, au bout de 1 an et 3 mois, et, dans le *Sacch. anomalus*, au bout de 6 mois, mais toujours chez un petit nombre d'individus.

Une variété constamment asporogène de *Sacch. anomalus* s'est aussi montrée dans une expérience pratiquée sur gélatine nutritive au moût additionné d'agar-agar (moût additionné de $1\frac{1}{2}$ p. c. d'agar-agar et de 5 p. c. de gélatine) à 34° C. Il semble que cette espèce ne puisse pas cesser de donner des voiles; en tous cas, celles de ses végétations asporogènes que j'ai observées, ont toutes continué cette formation.

Le *Sacch. Pastorianus* I n'a pas produit la variété constamment asporogène dans les expériences susmentionnées sur gélatine au moût à 25° C. et à la température ordinaire, tandis que cette formation a eu lieu sur gélatine nutritive au moût additionné d'agar-agar à environ 32° C. Le point de départ était, comme à l'ordinaire, l'inoculation superficielle d'une végétation douée d'une faculté sporogène vigoureuse. Différemment des expériences précédentes sur un milieu nutritif solide, de nombreux renouvellements ont eu lieu; chaque culture a séjourné 1 ou 2 jours. Dans la 22° culture, on a observé de nombreuses cellules sporogènes, tandis que la 31° culture se composait d'une végétation dont toutes les cellules étaient sans spores et qui gardaient constamment cette propriété.

De cette série d'expériences, j'ai formé une nouvelle série en prenant la 20° culture pour point de départ et en la faisant séjourner à 34° au lieu de 32° C. Les cellules produites de cette manière dans l'espace de 3 ou 4 jours se sont aussi montrées constamment asporogènes.

Sélection ou transformation?

Si l'on parcourt la littérature relative à la variation des plantes, on verra qu'en général la question de savoir si les phénomènes décrits sont dus à une sélection ou à une transformation, n'est pas posée, et dans le peu de cas où cette question est discutée, les opinions sont partagées et les résultats incertains.

Dans le chapitre introductif de son ouvrage intitulé *De danske Blomsterplanters Naturhistorie* (Biologie des Phanérogames danoises, 1895—99) M. Raunkiær soumet cette question à un examen détaillé. Il se range à l'avis des auteurs qui prétendent que les preuves qui sont ordinairement produites à l'appui de l'opinion que des phénomènes de variation sont dus à une transformation produite sous l'influence des facteurs extérieurs, ne sont pas satisfaisantes. Voici comment il s'exprime (p. LII) sur mes recherches: „Il paraît que nous avons ici la première preuve réelle d'une transformation de caractère produite par des facteurs extérieurs; mais seulement si l'on a le droit de le supposer, il n'existe aucune multiplication sexuelle chez les levures, de sorte qu'on ne peut pas expliquer le résultat obtenu en renvoyant aux différences qu'on trouve parmi les individus appartenant aux générations qui émanent d'un croisement*. Dans les communications provisoires auxquelles M. Raunkiær fait allusion, je ne me suis pas prononcé sur ce point; toutefois, dans la suite, j'ai fait de vastes recherches dans ce sens également, mais je n'ai jamais observé aucun indice d'une pareille multiplication.

En ce qui concerne les plantes supérieures, ce sont surtout les recherches sur les types sans semences et, quant aux microorganismes, les études de la forme asporogène du microbe de la fièvre charbonneuse, qui nous intéressent ici. Il existe un grand nombre de Phanérogames dont on connaît des variétés aspermes. Elles sont déjà mentionnées dans les plus anciens ouvrages de botanique et, par conséquent, elles sont observées depuis un temps immémorial. Les mieux connues sont les variétés aux grands fruits comestibles du bananier (*Musa sapientum*) et la variété du raisin dite Corinthe (*Vitis vinifera* var. *apyrena*). On trouve les premières dans un grand nombre de types cultivés; celles-ci, suivant les observations faites en Amérique par M. Rob. Brown et par d'autres, sont toutes sans semences, et la multiplication se fait donc toujours par voie végétative. Après des siècles de culture, elles se sont maintenues constantes. Au contraire, dans l'Asie méridionale, habitat originaire du bananier, les plantes sauvages se multiplient par graines, et les variétés aspermes qu'on y cultive retournent souvent aussi, à ce qu'on dit, au type primitif. En ce qui concerne la variété asperme susmentionnée du raisin, toutes les

relations portent qu'elle est tout à fait constante. On n'a que des renseignements incertains sur l'origine de ces variétés, et l'on ne sait rien de ce qu'on peut attribuer aux agents extérieurs et aux agents intérieurs. Depuis longtemps on connaît également des formes asporogènes de plusieurs des Cryptogames supérieures; mais à leur égard non plus nous n'avons pas de renseignements sur les questions qui sont d'un intérêt particulier pour nous.

Considérons ensuite les recherches faites à ce sujet sur la bactérie charbonneuse (*Bacillus Anthracis*). Pasteur, on le sait, publia une méthode de l'atténuation du virus. D'après cette méthode, les cellules sont cultivées un certain temps dans le bouillon neutre de poule à 42°—43° C. sans renouvellement du liquide nutritif. Dans quelques recherches sur l'influence qu'exercent certains toxiques à l'égard de cet affaiblissement, MM. Chamberland et Roux (*Compt. rend. LXXXXVI* (1883) et *Ann. de l'Inst. Past. IV* (1890)) ont constaté que les cellules perdent, au moins provisoirement, leur pouvoir sporifique, si on les cultive dans du bouillon additionné d'un peu d'acide phénique ou de bichromate de potasse, tandis qu'il n'en était pas ainsi dans l'expérience de Pasteur. Pendant cette expérience, les cellules n'ont produit, il est vrai, que peu ou point de spores; mais elles devenaient aussitôt vigoureusement sporifiques, si on les cultivait dans le susdit liquide nutritif à une température favorable. M. Heim répétant l'expérience de Chamberland et Roux constata qu'après avoir été traitées par les susdites matières chimiques, un grand nombre des cellules gardaient leur pouvoir sporifique et que les cellules qui pour le moment avaient cessé de donner des spores, reprenaient assez vite cette fonction après avoir été placées dans des milieux nutritifs favorables.

Après que j'eus publié ma deuxième communication sur les variétés asporogènes des *Saccharomyces*, M. Phisalix, dans ses expériences faites avec le *Bacillus Anthracis*, a employé la méthode décrite par moi en le cultivant par des renouvellements fréquents du liquide nutritif voisin de la température maxima pour la multiplication végétative (*Compt. rend. CXIV* (1892)). Il réussit de cette manière à produire une variété asporogène qui se maintenait même si on la cultivait dans du bouillon à une température favorable à la formation de spores. Cette expérience présenta assurément une plus grande constance et plus de régularité que celle de Chamberland et Roux. C'est seulement quand on ajoutait au dit bouillon quelques gouttes de sang d'un cobaye que les cellules retournaient à la formation de spores. Conséquemment, aussi dans l'expérience de Phisalix, la variation n'a été que provisoire. Conformément à ce fait, les cellules de la variété produite par lui contenaient des corpuscules brillants, où ce savant et

M. Chauveau voit des spores rudimentaires. La question fondamentale de savoir si la variation provisoire que je viens de décrire, est due à une sélection ou à une transformation, n'a point été examinée.

M. Alfr. Fischer (Vorlesungen über Bakterien, 1897, pp. 27, 70—72, 123—24) regarde l'atténuation du virus et la perte du pouvoir sporifique chez la bactérie charbonneuse comme un signe d'affaiblissement et de dégénération générale. Selon lui, on n'a engendré aucune nouvelle race vivace et aucune transformation ne s'est produite: ce n'est là qu'une modification passagère et malade. C'est à peu près de la même manière que Fischer considère mes variétés asporogènes des *Saccharomyces*, et il pense que les expériences faites jusqu'ici pour engendrer artificiellement des races douées de nouvelles propriétés morphologiques, ne sont pas convaincantes. La discussion de la question qu'il a posée concernant l'affaiblissement sera mieux à sa place dans mon prochain mémoire, où je me propose surtout de mentionner les propriétés des *Saccharomyces* asporogènes; les autres objections formulées par Fischer, seront mises en lumière dans le présent travail.

Examinons maintenant quel est le rapport entre mes expériences ci-dessus décrites et la question: Sélection ou transformation? Mes expériences faites avec le *Sacch. Pastorianus* I sont un peu obscures sur un point: comme on se le rappelle, il y avait des cellules asporogènes dans quelques-uns des points de départ. Si dans d'autres cas on n'en a pas constaté l'existence, la cause en est peut-être que j'ai pris pour base une cellule qui n'a eu aucune faculté de fonder une végétation mixte. Si nous pouvions simplement admettre ce point de vue, tout s'arrangerait à cet égard; mais on n'en a pas la certitude, puisque, comme je l'ai dit, on a souvent constaté l'existence de cellules asporogènes dans les végétations par lesquelles ont commencé les expériences. Si nous avons dû nous servir spécialement des expériences relatives à cette espèce pour élucider la question importante dont il s'agit, il nous eût fallu examiner les phénomènes de multiplication des différentes catégories de cellules qui apparaissent durant la culture et, en général, la concurrence qui a lieu. Mais ces recherches sont tellement difficiles, que je ne pourrai donner des renseignements à ce sujet que dans un mémoire ultérieur.

Pour approfondir la question: Sélection ou transformation? je me suis servi surtout du *Johannisberg* II. Bien que, comme on se le rappelle, j'aie fait successivement plusieurs milliers d'analyses de cette espèce, il n'a pas été possible de signaler une seule cellule qui pût fonder une végétation asporogène. Le point de départ des expériences était parfaitement pur dans tous les cas. Peut-être, toutefois, un scepti-

que extrême objecterait-il que si l'on avait encore augmenté le nombre des analyses, on eût pu trouver éventuellement un individu de la catégorie en question. La somme d'analyses étant aussi grande que dans le cas présent, une pareille objection, si elle était formulée, serait sans importance; mais heureusement l'argumentation n'a pas besoin de s'appuyer exclusivement sur l'examen du point de départ: nous pourrions aussi éclaircir le problème par d'autres voies.

Supposons qu'il y ait eu quelques cellules asporogènes dans les végétations par lesquelles les expériences ont commencé et que ce ne soit qu'une sélection et non une transformation qui a eu lieu; alors nous ne pourrions pas attendre que l'expérience réussisse avec toutes les cellules, mais il faut, dans ce cas, que nous ayons aussi des séries d'expériences qui persistent à se composer exclusivement de cellules sporogènes. En effet, l'analyse nous a appris avec certitude que cette dernière catégorie a la prépondérance absolue dans la semence. Cependant on constate que ceci n'arrive pas, et cela non seulement en ce qui concerne les deux espèces dont nous avons parlé ici, mais pour toutes les autres espèces qui ont été essayées, sans exception aucune. En un mot, la variation signalée est un phénomène général qui se présente toujours quand on soumet les cellules à la culture qu'on vient de décrire. Nous arrivons également d'un autre côté au même résultat principal.

Le point de départ de nos expériences relatives au Johannisberg II consistait toujours en cellules qui fondaient des végétations largement sporogènes. Quant à des cellules qui fondaient des végétations contenant très peu de cellules sporogènes, ou à des cellules qui jusqu'à nouvel ordre avaient cessé complètement de donner des spores, il n'y en avait point, pas plus que de cellules constamment asporogènes. Or, trouvant toujours ces formes intermédiaires après le commencement du traitement à la haute température et surtout dans les premières cultures, cela nous montre également que c'est une transformation qui a lieu. Si l'apparition de la variété asporogène ne dépendait que d'une sélection, on n'en aurait pas besoin du tout. Il va sans dire que, côte à côte à la transformation, il y a toujours concurrence et sélection.

Examinons de plus près ces formes intermédiaires. Si nous prenons une quelconque des séries d'expériences mentionnées dans ce qui précède, nous verrons que, tandis que l'analyse de 1000 cellules du point de départ nous donne toujours comme résultat qu'elles produisent toutes des végétations sporogènes, nous n'avons, après le commencement de la culture, qu'à isoler un nombre moitié moindre de cellules pour y trouver aussitôt des cellules asporogènes. Déjà, dans

la 2^e culture, elles existent en grand nombre, et en transportant directement sur blocs de plâtre les colonies formées sur gélatine au moût par cette culture, on verra qu'un grand nombre de ces végétations ne donnent pas de spores. Après quelques cultures en moût de bière, beaucoup d'entre elles retournent à l'état normal, tandis que d'autres se maintiennent encore constantes au bout de plus d'un an. Dans les cultures suivantes, nous trouverons un plus grand nombre de cellules constamment asporogènes. Au fur et à mesure du traitement, nous aurons, comme on l'a dit plus haut, un plus grand pour-cent de cellules asporogènes, et le nombre de celles qui après une culture continue en moût retournent à la forme sporogène, diminue toujours.

Aux différentes phases du traitement, nous pouvons trouver des cellules qui nous donnent des végétations possédant tous les degrés de faculté sporogène depuis 100 p. c. jusqu'à 0 p. c. Il vaut aussi la peine de remarquer ici le fait intéressant que, surtout dans les dernières cultures, nous pouvons isoler des cellules produisant chacune une descendance composée d'individus dont quelques-uns sont asporogènes, d'autres au contraire fortement sporifiques, et qui contient en outre des formes intermédiaires entre ces deux extrêmes. En continuant la culture à une température favorable et en répétant dans une végétation nouvelle l'isolement des cellules, on peut reproduire ce phénomène de telle sorte qu'une cellule sporogène détermine encore la formation des trois susdites catégories, et les cellules asporogènes qui apparaissent dans ces végétations peuvent conserver cette propriété à travers nombre de générations. On arrive à un résultat analogue en scindant la catégorie qui se distingue par la formation d'un très petit nombre de spores. On obtient également dans ce cas les trois catégories: des végétations produisant quantité de spores, très peu de spores et point de spores, et la catégorie très peu sporifique peut souvent se maintenir à travers des cultures très nombreuses. A ce sujet, j'ai fait des observations pendant plus de deux ans; une variété constante a fait son apparition. Cet état varié nous montre que l'équilibre du pouvoir sporifique des cellules a été diversement ébranlé, et voilà encore un phénomène nouveau, inconnu au point de départ.

Ainsi, ce n'est pas seulement l'analyse du point de départ, mais encore toutes les recherches des différents côtés du phénomène, qui nous montrent que c'est une transformation qui a lieu, et nous avons tout lieu d'admettre que cela ne s'applique pas seulement à la susdite espèce, mais encore à toutes les autres espèces de *Saccharomyces*. Comme on l'a vu, un appui important de cette opinion, c'est le fait que non seulement chaque

cellule végétative, mais même chaque spore fonde une végétation que le traitement décrit rend asporogène.

Si nous soumettons les expériences sur gélatine au moût à une analyse semblable à celle que nous venons de décrire, nous verrons également que, dans le plasma de ces cellules, il a surgi une combinaison nouvelle et que, dans ce cas-là, la variation tient aussi à une transformation.

Sur les conditions de la transformation.

Dans les recherches qui vont suivre, on traitera d'abord les expériences faites dans des liquides et ensuite les expériences pratiquées sur un milieu nutritif solide. Quant aux premières, il faut distinguer les facteurs suivants: la composition chimique, les oscillations dues à l'agitation, l'aération et la température. Examinons séparément chacun de ces facteurs.

Si nous considérons les expériences décrites faites en moût de bière, nous éprouverons aussitôt l'impression que ce n'est guère sa composition chimique spéciale qui détermine la transformation. En effet, le moût de bière est une substance très variable, même dans le cas où on le tire d'une seule et même brasserie; néanmoins, comme on se le rappelle, la transformation se produisait toujours, et il en était ainsi, non seulement des deux espèces sur lesquelles portaient principalement les expériences mentionnées dans le présent travail, mais encore de toutes les espèces essayées.

Pour éclaircir cette question, j'ai fait des expériences avec d'autres liquides que le susdit; la méthode était du reste la même. Quant au Sacch. Pastorianus I, elles furent pratiquées soit dans de l'eau distillée, soit dans des solutions d'eau de levure additionnée, dans une série, de 10 p. c. de saccharose, dans une autre, de 10 p. c. de dextrose, et, dans une troisième, de 5—10 p. c. de maltose. Dans les trois solutions sucrées, la transformation eut lieu de la même manière que dans le moût, toutes les cellules de la 7^e culture ayant été transformées. Dans une des séries d'expériences faites dans l'eau, on ne trouva dans la 7^e culture point de cellules transformées, tandis que, dans une autre expérience semblable, il y eut une seule cellule asporogène. Autrefois j'ai vu dans ce phénomène un signe de ce qu'une transformation n'avait probablement pas lieu dans l'eau; les expériences ci-dessous faites avec le Johannisberg II démontrent qu'en tout cas cela ne s'applique pas à cette espèce. Ces expériences furent faites soit dans de l'eau distillée, soit dans une solution composées des substances suivantes:

peptone.....	1 p. c.
maltose.....	5 —

1° phosphate de potassium	0,3 p. c.
sulfate de magnésium	0,5 —
eau.....	93,2 —

La levure employée à cette dernière expérience avait été engendrée dans le liquide nutritif décrit, puis lavée, pendant quatre heures et à environ 5° C., avec de l'eau stérilisée. Le traitement eut lieu à 36° C.; il était le même que dans toutes les expériences correspondantes en moût de bière ci-dessus décrites. Vers la fin de la 8° culture, on fit répartir sur plaques les cellules, ce qui donna comme résultat qu'à cette phase on trouvait quelques cellules constamment asporogènes; mais en pleine 15° culture encore, le nombre des cellules de cette catégorie n'était pas grand.

J'ai fait deux expériences avec cette même espèce dans de l'eau distillée, d'ailleurs de la même manière que la précédente. Toutefois, dans l'une de ces expériences, le lavage a eu lieu d'une manière plus radicale encore, à savoir pendant trois jours avec des renouvellements répétés de l'eau et à 2° C. Dans ces expériences, la levure avait été engendrée en culture en moût. Après que le traitement eut atteint, à 36°, la fin de la 4° culture, on trouva un petit nombre de cellules constamment transformées, et dans les cultures postérieures ce nombre augmenta; mais dans la 15° culture il y avait toutefois de nombreuses cellules sporogènes.

Ces expériences nous apprennent ainsi que la transformation se produit dans des liquides d'une composition chimique très différente, et même dans de l'eau distillée. Un liquide d'une composition déterminée n'est donc pas nécessaire. La composition chimique ne joue un rôle qu'autant que, dans l'eau et dans les autres liquides défavorables à la nutrition et à la multiplication, on n'obtient qu'un petit nombre de cellules transformées, et que, dans le moût de bière et dans les solutions sucrées en eau de levure susmentionnées, on en a au contraire un grand nombre.

Examinons ensuite si les oscillations du liquide dues à l'agitation qu'on pratique deux fois toutes les vingt-quatre heures en vue de l'aération, exercent ou non quelque influence sur la transformation. Pour éclaircir cette question, j'ai fait de la manière suivante quelques séries d'expériences avec le *Sacch. Pastorianus* I à 32° C. et le *Johannisberg* II à 36° C. Après avoir mis la levure dans des ballons chargés du moût ordinaire, je les plaçai aux températures indiquées, après quoi ils furent abandonnés pendant vingt-quatre heures. Puis on enleva le liquide, et un échantillon moyen du précipité de la levure fut transporté dans d'autres ballons chargés de moût. En un mot, les cultures se formèrent de la même manière que dans les ex-

périences ordinaires de transformation; seulement les levures ne furent exposées à aucune agitation. La transformation eut lieu tout de même, et par conséquent on en vint à constater que les oscillations ne sont pas nécessaires. Toutefois elles ont une importance indirecte en ce qu'elles ont pour effet d'éliminer l'acide carbonique, de mettre les cellules en contact avec de nouvelles particules nutritives et de faire affluer l'air.

Passons à l'étude des deux facteurs, aération et température.

La première question à poser à propos de l'aération touche à la possibilité de produire une transformation par l'air sans l'aide d'une haute température. C'est pourquoi les expériences qui suivent ont été faites avec les deux espèces susdites. Dans la première série, le dispositif des expériences fut exactement celui qu'on a décrit plus haut pour les essais ordinaires de transformation dans le moût de bière, à cela près que les ballons furent tenus à 25° C. au lieu de subir de hautes températures. Bien que ces expériences aient été prolongées à travers de nombreuses cultures et que plusieurs de ces cultures aient subi un très grand nombre d'analyses, il n'y a pas eu signe de transformation; cette transformation ne se produit pas dans les conditions d'expériences indiquées. On pourrait cependant croire qu'elle aurait lieu, si l'on augmentait la quantité d'air et le degré d'oxydation; aussi a-t-on fait de nouvelles expériences avec les deux espèces, soit en effleurant le liquide d'un courant d'air uniforme et continu, soit par insufflation d'air dans le liquide même, ce qui ôtait toute chance d'accumulation à l'acide carbonique formé durant la fermentation; surtout dans le dernier cas, l'aération était très active. On y a ajouté des séries d'expériences analogues faites avec de l'oxygène pur. Dans tous les cas, on prit la précaution de prévenir toute infection à l'aide de filtres au coton. Les analyses ont compris 10 cultures dans certains cas et 14 dans d'autres. Le résultat fut, encore dans ces conditions, l'absence de transformation.

Le Sacch. Pastorianus I fut en outre l'objet d'une série d'expériences où l'on insuffla un courant d'oxygène, comme on l'a décrit ci-dessus, mais cette fois à 32° C. Le choix de cette température força à formuler la question autrement que dans les cas précédents et à se demander si en pareilles circonstances la transformation serait plus prompte et plus énergique. On constata que non.

Ces expériences ont donc toutes établi que, sans élévation de température, l'aération est aussi impuissante à déterminer la transformation que les facteurs ci-devant examinés.

En considérant de plus près les expériences, on voit que la transformation est précédée d'une multiplication; le plus grand nombre de

cellules transformées nous a été fourni par les conditions d'expériences dans lesquelles la multiplication était la plus grande; c'est en effet ce qui ressort clairement de la comparaison entre les expériences faites avec l'eau et celles faites avec le moût. C'est un fait établi depuis longtemps que l'aération joue un rôle important à l'égard de la reproduction; il se peut même qu'elle contribue directement à la transformation en oxydant le protoplasma des cellules. Les expériences mentionnées p. 32 montrent que la transformation avait également lieu dans un liquide abandonné à lui-même, où par conséquent l'aération était moindre que dans les expériences ordinaires. Dans des cultures en moût du *Johannisberg II*, non seulement abandonnées à elles-mêmes à 36° C., mais dont le liquide n'était pas renouvelé non plus, on vit aussi se former après quelques jours de repos un petit nombre de cellules constamment asporogènes. Il n'est donc pas besoin d'une aération spéciale; mais il n'est pas probable que la transformation puisse avoir lieu, si les cellules sont complètement isolées de tout air.

Dans le but de faire connaître l'effet de l'aération, nous communiquons l'expérience suivante faite avec le *Johannisberg II*. On sema comme d'ordinaire une végétation jeune et vigoureuse à la température de 36° C. Le moût employé venait d'être purgé d'air par ébullition. Une culture fut abandonnée à elle-même à l'abri des agitations; une autre fut agitée deux fois par jour; on les dénomma, en conséquence, culture calme et culture agitée. A 24 heures d'intervalle, on produisit de nouvelles cultures en suivant d'ailleurs les mêmes dispositifs et méthodes que ci-dessus.

Aussi bien dans la 2° culture que dans la 3°, par conséquent au bout de 2 et de 3 jours de traitement à haute température, on constata ce que mentionnent les pages 35 et 36, savoir que dans la culture agitée il y avait des cellules transformées un peu plus nombreuses que dans la culture calme; mais cette différence devint plus saillante encore, quand les cellules datèrent d'une culture de trois mois à la température ordinaire. Il s'était alors produit dans quelques-unes des cellules asporogènes une régénération beaucoup plus considérable dans la végétation engendrée sans agitation que dans celle avec agitation. Dans la 2° culture, le rapport entre les cellules sans spores des deux cultures était alors $\frac{44}{30}$ et dans la 3° $\frac{109}{84}$, les numérateurs correspondant au contenu des cultures agitées et les dénominateurs à celui des cultures calmes. On constata que, dans les cultures où l'aération était le plus abondante, non seulement la transformation était tout de suite la plus grande, mais encore elle était plus persistante que dans les cultures moins aérées. Un autre essai qui rend encore plus palpable l'action de l'air, sera communiqué dans mon prochain mémoire sur la variation.

Analyse de la 2^e culture agitée.

330 colonies dues à une répartition sur gélatine au moût.	172 étaient grandes et donnèrent directement sur bloc de plâtre:	127 végétations sporogènes.			
		45 végétations asporogènes qui, aussitôt après 1 culture en moût, donnèrent:	27 végétations sporogènes.		
	158 étaient petites et furent aussitôt mises en moût, puis cultivées de la manière ordinaire sur bloc de plâtre, d'où résultèrent:		18 végétations asporogènes.	Ces 61 végétations sans spores ayant séjourné 3 mois, puis subi 2 cultures en moût, donnèrent:	17 végétations sporogènes.
			43 végétations asporogènes.		44 végétations asporogènes.
			115 végétations sporogènes.		

Analyse de la 2^e culture calme.

330 colonies dues à une répartition sur gélatine au moût.	221 étaient grandes et donnèrent directement sur bloc de plâtre:	170 végétations sporogènes.			
		51 végétations asporogènes qui, aussitôt après 1 culture en moût, donnèrent:	26 végétations sporogènes.		
	109 étaient petites et furent aussitôt mises en moût, puis cultivées de la manière ordinaire sur bloc de plâtre, d'où résultèrent:		25 végétations asporogènes.	Ces 58 végétations sans spores ayant séjourné 3 mois, puis subi 2 cultures en moût, donnèrent:	28 végétations sporogènes.
			33 végétations asporogènes.		30 végétations asporogènes.
			76 végétations sporogènes.		

Analyse de la 3^e culture agitée.

500 colonies dues à une répartition sur gélatine au moût.	{	300 étaient grandes et donnèrent directement sur bloc de plâtre:	147 végétations sporogènes.			
			153 végétations asporogènes qui, aussitôt après 1 culture en moût, donnèrent:	95 végétations sporogènes.		
				58 végétations asporogènes.	Ces 160 végétations sans spores ayant séjourné 3 mois, puis subi 2 cultures en moût, donnèrent:	51 végétations sporogènes.
		200 étaient petites et furent aussitôt mises en moût, puis cultivées de la manière ordinaire sur bloc de plâtre, d'où résultèrent:		102 végétations asporogènes.		109 végétations asporogènes.
						98 végétations sporogènes.

Analyse de la 3^e culture calme.

500 colonies dues à une répartition sur gélatine au moût.	{	324 étaient grandes et donnèrent directement sur bloc de plâtre:	220 végétations sporogènes.			
		104 végétations asporogènes qui, aussitôt après 1 culture en moût, donnèrent:	49 végétations sporogènes.			
			55 végétations asporogènes.	Ces 135 végétations sans spores ayant séjourné 3 mois, puis subi 2 cultures en moût, donnèrent:	71 végétations sporogènes.	
		176 étaient petites et furent aussitôt mises en moût, puis cultivées de la manière ordinaire sur bloc de plâtre, d'où résultèrent:	80 végétations asporogènes.		64 végétations asporogènes.	
			96 végétations sporogènes.			

Dans ce qui précède, nous avons appris que la transformation des deux espèces n'a pas lieu quand on fait les expériences à la température ordinaire ou à 25°C. , même en satisfaisant à toutes les autres conditions. Il en résulte donc qu'une haute température est nécessaire, si l'on choisit le dispositif d'expériences indiqué. En examinant les résultats des recherches, nous trouvons que c'est là le facteur le plus essentiel. Toutefois, son influence sur le plasma des cellules nous est aussi mal connue que celle des autres facteurs. C'est ici que s'ouvrent de nouvelles questions pour les recherches futures.

Nous allons maintenant étudier les conditions qui concourent à la transformation sur milieu nutritif solide. Les expériences décrites p. 24 et faites sur gélatine au moult, nous montrent qu'il se produit des transformations provisoires dans toutes les espèces qu'on a traitées par ce procédé, mais que les variétés constamment asporogènes ne figurent que dans quelques-unes de ces espèces. Durant ces expériences, la transformation se manifesta dans des circonstances toutes différentes de celles des expériences portant sur les liquides; elle avait lieu aussi bien à la température ordinaire qu'à 25°C. ; l'élévation de la température était inutile et le milieu nutritif ne fut pas renouvelé. Ce dernier point est important pour notre étude. Afin de le rendre encore plus clair, je fis avec le *Johannisberg II*, dont le point de départ est pur, comme les analyses nous l'ont montré, l'expérience ci-dessous. Dans une des séries, le milieu nutritif fut fréquemment renouvelé, des cellules étant transportées d'une culture sur gélatine à une autre, à intervalles rapprochés. Dans l'autre série, on ne fit aucun renouvellement. La première de ces séries ne donna aucune transformation, bien que la reproduction fût très active et que l'aération se fît exactement comme dans la série sans renouvellements. Les cellules de la seconde série ayant séjourné 15 mois sur la même gélatine au moult, la transformation s'était manifestée. Mais alors aussi la gélatine s'était liquéfiée, signe d'apparition de modifications chimiques absentes au début de l'expérience et qui n'ont pas non plus atteint les végétations transportées à courts intervalles sur une nouvelle gélatine nutritive, et par conséquent c'est ici qu'il faut chercher la condition essentielle de la transformation constatée dans ces expériences. La température y joue bien un rôle, mais il se borne à ce que la transformation est plus lente à la température ordinaire qu'à 25°C. D'ailleurs, les biologistes sont assez habitués à voir le même résultat obtenu par des moyens différents.

En quelques-unes des espèces soumises au traitement à la gélatine nutritive tel qu'il a été décrit, on ne constata qu'une transformation

fugace; il faut y ranger le *Sacch. Pastorianus* L. Dans les expériences décrites p. 25, au contraire, cette dernière espèce fut transformée en une variété constamment dépourvue de spores et de voiles, si la culture ayant lieu sur un milieu solide, subit de fréquents renouvellements de ce milieu à 32° et à 34° C. au lieu des basses températures mentionnées. Cela nous montre que même dans les expériences sur milieu nutritif solide, la température élevée peut figurer comme facteur essentiel. On finira probablement par constater la même chose dans des espèces autres que le *Sacch. Pastorianus* L.

Septembre 1900.

Recherches sur les bactéries acétifiantes.

(Troisième mémoire.)

Par

Emil Chr. Hansen.

Le présent mémoire donne communication de nouvelles recherches sur la limite de vitalité et la variation des trois espèces que j'ai décrites. M. Schiønning, attaché au Laboratoire, m'a prêté la main pour les analyses.

Limite de vitalité.

Les premières contributions sous ce rapport ont été communiquées dans mon second mémoire (Compt. rend. du Laborat. Carlsb. III, 210 (1894)) qui décrit également les procédés ainsi que les espèces traitées. Les nouvelles recherches qu'on va présenter, renseignent d'abord sur la vitalité des cellules sur milieux nutritifs tels que bière basse de garde, bière double, sucre de canne dissous (à 10 p. c.) dans l'eau, et eau distillée. On rapporte ensuite les expériences sur la limite de vitalité durant la dessiccation. Ce sont là les phénomènes qui, d'une part, intéressent en particulier le problème de trouver la meilleure méthode de conservation et, d'autre part, nous renseignent sur la vie de la cellule dans la nature.

Bact. aceti.

Dans la bière basse de garde, cette bactérie est restée vivante durant plus de 9 années. Dans la bière double, sa vie a parfois dépassé 6 ans; dans d'autres cas, elle est morte en moins de 5 ans. Dans une solution de saccharose, la limite de sa vitalité était d'environ 2 ans; dans l'eau, elle était autour de 16 mois.

Bact. Pasteurianum.

Dans la bière basse de garde, sa vie a dépassé 10 ans, bien qu'en un cas isolé cette bactérie soit morte au bout de 1 à 2 années.

Dans la bière double, elle a généralement vécu plus de 6 ans; dans un cas, la mort est survenue au bout de 27 mois. Dans une solution de saccharose, la limite de vitalité a été d'environ une année; dans l'eau, cette bactérie est morte au bout de 6 ou 12 mois.

Bact. Kützingianum.

Quelques-unes de ses cultures sont restées en vie dans la bière basse de garde pendant plus de 7 ans, tandis que d'autres ne se conservaient en vie que pendant 5 ans environ. Dans la bière double, sa vie a généralement dépassé 6 ans, bien que certaines cultures l'aient vue succomber après 5 ans d'existence. Dans une solution de saccharose, la limite de vitalité était d'environ une année, et de 9 mois dans l'eau.

En général les trois espèces susdites ont vécu plus de 4 ans dans la bière basse de garde, et de nouvelles expériences m'ont également révélé ce liquide comme le meilleur excipient pour conserver ces cellules. On se rappellera que mon mémoire sur la vitalité des *Saccharomyces* (Compt. rend. du Laborat. Carlsb. IV, 93 (1898)) mentionne la grande importance de la solution de saccharose pour conserver les levures et plusieurs moisissures. L'expérience précédente nous révèle au contraire qu'il n'en est point ainsi des bactéries acétifiantes: elles ne conservent que peu de temps leur vitalité dans ce liquide, et à cet égard l'eau ne leur est pas non plus favorable.

Les expériences rapportées dans mon second mémoire montrent qu'à l'état sec, de jeunes et vigoureuses cellules de *Bact. Pasteurianum* se sont maintenues en vie plus de 4 mois, mais n'ont point dépassé 5 mois. Dans ces expériences, une petite quantité de ces cellules fut placée sur un morceau de fil de platine qu'on introduisit dans un matras Freudenberg vide à la température ordinaire. En répétant cette expérience sur l'espèce susdite, sur le *Bact. aceti* et sur le *Bact. Kützingianum*, j'ai constaté que pour tous les trois la limite de vitalité, en pareilles circonstances, se tient autour de 5 mois, c'est-à-dire précisément le résultat auquel j'étais parvenu antérieurement dans mes essais sur le *Bact. Pasteurianum* seul. C'est également de cette manière que se comportèrent ces espèces quand je tins à 40° C., au lieu de la température ordinaire, les matras contenant les cellules desséchées.

Dans le but de découvrir, si possible, une méthode capable de faire vivre les cellules desséchées plus longtemps que dans les cas précédents, j'ai fait sur les trois espèces les expériences suivantes. Je fis d'abord séjourner à la température ordinaire pendant deux jours les fragments de fil de platine chargés de cellules et introduits dans des

matras Freudenberg, après quoi je les fis passer dans le tube représenté ci-contre (fig. 1 en demi-grandeur) et fermai aussitôt à la lampe ce tube en *a*. Une série de ces tubes fut tenue dans une armoire à l'abri de la lumière et à la température ordinaire, une autre série mise dans le thermostat à 2° C. On constata que pour la première série la limite de vitalité était d'environ 5 mois comme dans les expériences précédentes, tandis que pour la seconde série cette limite dépassait une année. La vie des cellules desséchées a donc été notablement prolongée quand on les a conservées à une basse température: en conséquence on peut appeler le nouveau procédé un progrès. Dans les expériences à la température ordinaire, l'exclusion ou l'admission de l'air n'importait nullement; les cellules qui se trouvaient dans les tubes fermés à la lampe avaient la même limite d'existence que celles enfermées dans les matras Freudenberg des premières expériences décrites. En sera-t-il ainsi à une température inférieure? On ne le voit pas. En tout cas, il est commode de conserver en tubes fermés comme on vient de le mentionner, justement parce que la température est basse; car un long séjour en glacière dans des tubes ou dans des matras où l'air peut pénétrer, expose les cultures à l'attaque du *Penicillium glaucum* et d'autres Moisissures.

Pour voir combien il est important de dessécher avant de fermer les tubes, je fis une expérience spéciale où je fermai les tubes aussitôt après y avoir introduit les fragments de fil de platine chargés des cellules humides. Il en résulta que ces cellules moururent en moins de 5 mois, tant à la température ordinaire qu'à 2° C. Si, dans ces analyses, on passe le tube à la flamme pour en stériliser la surface avant d'ouvrir et de laisser tomber le fil de platine dans un matras contenant un liquide nutritif, il va

de soi qu'on doit veiller à ce que les cellules mêmes ne soient pas exposées à une haute température. On y réussit en ne passant par la flamme que la partie du tube située en *a*, fig. 1, et en ouvrant en ce point.

Aujourd'hui qu'on est en voie d'introduire dans la fabrication du vinaigre la culture pure d'espèces et de races choisies, cette industrie, autant que celle de la fermentation alcoolique, est particulièrement intéressée à pouvoir conserver les cellules dans l'état où elles se trouvent à un moment donné. Au reste, touchant la discussion des méthodes de conservation, on voudra bien se reporter au mémoire



Fig. 1.

de 1894, déjà cité, ainsi qu'à mon mémoire paru en 1898 dans le même périodique et traitant de la vitalité des ferments alcooliques.

De la variation.

Mes deux mémoires précédents sur les bactéries acétifiantes contiennent une série de communications sur la variation des cellules et surtout sur leur richesse de formes et sur les facteurs qui y déploient leur activité. Dans mon mémoire de 1894, p. 194, j'ai constaté que c'est la couche gélatineuse des cellules du *Bact. Pasteurianum* et du *Bact. Kützingianum*, à laquelle l'iodure de potassium iodé et certaines autres solutions d'iode font produire la réaction bleue particulière à ces espèces, et, p. 195, j'ai mis en relief l'observation que j'ai faite de l'impuissance où elles arrivent enfin de donner cette réaction, tant dans des liquides que sur milieu solide. Toutefois cette variation était d'un caractère fugace et irrégulier. Après moi, M. Beijerinck a fait une observation analogue¹⁾: il a trouvé qu'une espèce conçue par lui comme *Bact. Pasteurianum* et placée en cultures en stries sur gélatine à la bière, développait certaines cellules dont la couche gélatineuse avait perdu le pouvoir de bleuir par la solution d'iode et qui en restaient là après une culture continue sur un nouveau milieu nutritif. M. Hoyer répéta ces expériences dans le laboratoire de Beijerinck, et arriva au même résultat²⁾. Si, comme les indications de Beijerinck et de Hoyer me le font supposer, la culture sur gélatine à la bière devait toujours être accompagnée d'une pareille variation constante et qu'il y eût là une règle fixe, il y aurait un intérêt spécial à réitérer ces recherches et à les étendre. On disposerait alors d'un procédé commode pour éclaircir des relations importantes de la variation. On ne peut probablement pas imaginer un objet qui se prête mieux à l'analyse. Dans l'espace de quelques minutes on est à même d'étudier, à ce point de vue, plusieurs milliers de végétations. En effet, pour décider si cette variation de la couche gélatineuse a lieu ou non, il suffit de répartir les cellules à la surface d'une gélatine au moult à l'aide d'un pinceau en platine, et quand les colonies développées sont perceptibles à l'œil nu, on verse dessus une solution d'iodure de potassium iodé. Je résolus donc de reprendre mes recherches à ce sujet et surtout de faire un essai sur la gélatine à la bière.

Bien que dans ce qui précède il ait été question seulement du *Bact. Pasteurianum*, je n'en ai pas moins trouvé à propos de faire

¹⁾ Beijerinck, Ueber die Arten der Essigbakterien (Centralbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde, etc. 2. Abt., IV, 209 (1898)).

²⁾ Hoyer, Études sur les bactéries acétifiantes (Archives néerlandaises des sciences exactes et naturelles [2] II, 190 (1899)).

figurer le *Bact. Kützingianum* dans mes expériences. On plaça les cellules, en cultures en stries, sur des couches épaisses de gélatines telles que gélatine à la bière (soit bière double, soit bière basse de garde), gélatine au moût, gélatine au moût additionnée d'agar-agar et gélatine à l'eau de levure additionnée de saccharose, dont mes mémoires précédents donnent les formules.

Les expériences sur gélatine au moût additionnée d'agar-agar furent faites à 32°—33° C., et à 25° sur les autres gélatines nutritives. Toutefois on expérimenta aussi, à la température ordinaire, avec le *Bact. Pasteurianum* sur les deux gélatines à la bière. A divers moments, chaque culture subit la répartition sur plaques mentionnée plus haut des échantillons moyens des cellules, puis on examina chaque fois 3—4000 colonies; on avait préalablement fait un essai analogue des points de départ.

La culture du *Bact. Pasteurianum* fut poursuivie durant une année. A la clôture des expériences, cette espèce donna bien dans tous les cas quelques cellules dont la couche gélatineuse avait temporairement perdu le pouvoir de produire la substance qui donne la réaction bleue par les solutions d'iode; mais, cultivées en bière double, ces cellules revinrent promptement à l'état normal. Bref, c'était là concorder parfaitement avec mes observations antérieures.

Les expériences avec le *Bact. Kützingianum* furent faites de la même manière que pour le *Bact. Pasteurianum*, excepté toutefois la température ordinaire, et je les interrompis au bout d'environ 8 mois. Ici aussi, ce fut dans toutes les cultures qu'on constata la transformation temporaire des cellules. La transformation constante d'un petit nombre de cellules fut constatée dans des végétations sur gélatine au moût à 25° C., sur gélatine au moût additionnée d'agar-agar à 32°—33° C. et sur gélatine à la bière basse de garde à 25° C. La majeure partie des cellules n'était pas transformée, et là aussi on constata une grande irrégularité. En répétant ce genre d'expériences, j'ai trouvé, dans quelques cas, des cellules à transformation constante; dans d'autres, je n'en ai pas trouvé. Par cellules constamment transformées j'entends, ici comme dans la suite, celles qui ne donnèrent pas la susdite réaction bleue et qui persistèrent dans cet état durant toute une année encore, bien que cultivées dans des conditions favorables. Nous employons le terme transformation pour mieux nous exprimer sur cet état de choses. La transformation est-elle réelle ou non? C'est ce que l'irrégularité des résultats ne permet pas de décider.

Dans les nouvelles expériences sur les gélatines nutritives, le *Bact. Pasteurianum* ne subit donc, comme antérieurement, qu'une transformation purement provisoire, et les indications de Beijerinck

et de Hoyer n'ont pas été confirmées. Selon toute probabilité, ils n'ont pas opéré sur cette bactérie: c'est plutôt sur le *Bact. Kützingianum* ou telle autre espèce qui s'en rapproche; mais, comme nous l'avons vu, ce n'est pas non plus pour le *Bact. Kützingianum* que la culture sur gélatine à la bière ou autres gélatines fournit un procédé certain pour déterminer une variation fixe et héréditaire.

Dans les cultures en bière qui avaient séjourné longtemps, j'ai également pu constater de temps à autre la présence de certaines cellules ayant perdu, au moins pour un temps, le pouvoir de donner la réaction bleue; mais je ne découvris pas plus de règle ici que dans les cas précédents. Dans ces cultures, le *Bact. Pasteurianum* s'est comporté de la même manière que le *Bact. Kützingianum*.

De ses observations sur la couche gélatineuse, Beijerinck conclut que le *Bact. Pasteurianum* doit plutôt être considéré comme variété d'un des types dont la couche gélatineuse ne donne pas la réaction bleue décrite, et il classe de même l'espèce décrite par moi sous le nom de *Bact. aceti*, ainsi que les deux espèces de Henneberg, savoir le *Bact. oxydans* et le *Bact. acetosum*; il les comprend dans la catégorie de l'espèce établie par lui, *Bact. rancens*.

Comme on le sait, il arrive généralement, même aux plantes supérieures, qu'un de leurs caractères peut disparaître; il n'y a donc aucune raison de remanier ainsi la classification des bactéries acétifiantes; en outre, le *Bact. Pasteurianum* se distingue des espèces en question par plusieurs caractères autres que le précité, et aucune de ces espèces n'est capable de produire la couche gélatineuse qui bleuit par la solution d'iode. Ce caractère est en somme un des meilleurs que nous connaissions aux bactéries; il a un haut degré de constance, ainsi que l'ont montré les expériences décrites antérieurement. Beijerinck maintient provisoirement en qualité de „fait reconnu par tout le monde“ l'espèce *Bact. Pasteurianum*; mais, selon lui, c'est une erreur qui devrait bien être rectifiée, et mon espèce devrait être remplacée par la nouvelle espèce qu'il a décrite. Les objections qu'il fait à l'adoption de l'espèce *Bact. Kützingianum* sont d'une teneur si générale, qu'il n'y a pas à les discuter. D'ailleurs, cette même espèce est aussi reconnue par les spécialistes compétents: elle est, à l'instar de la précédente, établie non sur un seul caractère, mais sur plusieurs, et ces caractères ne se bornent pas à un seul mode de culture déterminé. MM. Henneberg et Seifert ont ajouté de nouveaux caractères distinctifs à ceux que j'ai marqués pour différencier ces deux espèces.

Voici ce que Beijerinck dit de l'espèce que j'ai décrite sous le nom de *Bact. aceti*: „M. Hansen commet la même erreur que

M. Brown en dénommant cette espèce *Bact. aceti*. Ni Hansen ni Brown n'ont aucune connaissance du *Bact. aceti*, Pasteur⁴. Cette manière de parler aussi est peu claire. La désignation spécifique *aceti* n'est point due à Pasteur, comme Beijerinck semble le supposer, mais à Kützing, et je l'ai adoptée parce qu'elle avait déjà cours dans les livres. Elle représentait alors les bactéries acétifiantes en général et non pas une unité systématique et définie. Pasteur s'est procuré des semences pour ses essais en exposant à l'action de l'air des liquides composés d'eau, de vinaigre, d'alcool, de bière ou de vin. Dans les différentes expériences qu'il a faites de la sorte, il devait obtenir tantôt une espèce, tantôt une autre et parfois un mélange de plusieurs. Des expressions de Beijerinck, p. 215, il ressort que lui aussi a réellement vu les choses ainsi. En effet, il y admet que, „par hasard et sans le savoir“, Pasteur ait eu plusieurs espèces dans ses cultures. En somme, c'est peine perdue que de demander, soit à Pasteur, soit à d'autres auteurs de ce temps-là, de quelles espèces ils ont voulu parler. Beijerinck mentionne plus tard une espèce qu'il dénomme „*Schnellessigbakterie*“, ayant une tendance à former voile sur un liquide nutritif composé de l'eau ordinaire des conduits, d'alcool, de phosphate d'ammoniaque et de chlorure de potassium. Partant de l'idée que ce liquide a la même composition que celui employé dans le temps dans quelques-unes des expériences de Pasteur, il veut y voir une base pour établir que cette „*Schnellessigbakterie*“ non seulement est le vrai *Bact. aceti*, mais appartient en même temps à l'espèce sur laquelle Pasteur a opéré. Il en vient à contredire en masse ce qu'il a dit plus haut. Et ce liquide nutritif artificiel! C'est bien en cela que le liquide de Beijerinck est tout différent de celui de Pasteur. La cause en est, non seulement que Beijerinck emploie l'eau ordinaire des conduits, ce qui fait qu'en réalité la solution devient, comme milieu nutritif pour bactéries, d'une composition chimique très variable, mais, à d'autres égards encore, il y a de fortes divergences. En effet, le liquide nutritif artificiel employé par Pasteur avait la composition que voici: acide acétique cristallisable, alcool absolu, phosphate d'ammoniaque, phosphate de magnésie, phosphate de potasse, phosphate de chaux et eau distillée. Ces raisons suffisent pour rendre inadmissibles les conclusions tirées par Beijerinck. A cela s'ajoute ce fait établi par mes recherches, qu'on trouve plusieurs espèces de bactéries acétifiantes, entre autres aussi des bactéries typiques de la bière, capables de croître dans des liquides artificiels comme les précités, ainsi que le fait que telles bactéries préfèrent un de ces liquides et que d'autres bactéries veulent d'autres de ces liquides.

Outre les variations mentionnées, on peut encore faire ressortir

ici qu'un long séjour dans la culture en bière met les espèces en état de développer des cellules qui ont plus ou moins complètement perdu le pouvoir de former des voiles et ces longs chapelets d'articles courts; mais la formation de voiles est un des caractères sur lesquels Beijerinck compte spécialement pour appuyer sa classification des espèces, tandis qu'il n'attache aucune importance à ce phénomène morphologique capital de la présence ou de l'absence de cils dans les espèces. Elle aussi, la composition chimique des zooglées du *Bact. xylinum* peut varier de manière à ne plus donner la réaction de la cellulose. Pour être conséquent, Beijerinck aurait donc dû rejeter cette espèce, elle aussi, et pourtant il n'en fait rien; bien mieux, il devrait rejeter également les espèces qu'il a lui-même établies; car elles varient toutes dans les caractères qu'il met en relief. Cela suffira pour montrer quelles objections on peut élever contre les tentatives systématiques de Beijerinck.

Pour le moment c'est à l'analyse qu'il faut attacher de l'importance; jusqu'à nouvel ordre, la question de savoir s'il faut regarder les unités systématiques trouvées ou comme espèces, ou comme variétés, présente peu d'intérêt. L'investigateur, il est vrai, doit s'attendre à des difficultés à propos de la variation; mais elles ne sont ni plus grandes ni d'autre nature que quand il s'agit d'autres groupes de bactéries.

Septembre 1900.

Phénomènes d'accroissement perforant et de formation anormale des conidies chez le *Dematium pullulans*, de Bary, et autres Champignons.

Par

Alb. Klöcker et H. Schiöningg.

Il y a quelques années, M. Alfred Jörgensen¹⁾ publia une communication sur certains corpuscules trouvés dans les cellules du *Dematium pullulans*, de Bary; peu après, M. Weleminsky²⁾ publia un mémoire sur le même sujet. Ces deux auteurs voyaient dans les corpuscules en question de véritables endospores. Depuis longtemps déjà nous avons fait des observations analogues qui nous avaient amenés à un tout autre résultat que celui de Jörgensen et de Weleminsky concernant la valeur morphologique de ces corpuscules; en conséquence, nous publiâmes une communication provisoire³⁾ dans laquelle nous montrâmes que les susdits corps sont, non pas des endospores, mais bien des conidies de formation anormale. En outre nous fîmes voir que cette même formation anormale de conidies a également lieu chez l'*Oïdium lactis*, Fresenius. Nous promîmes de traiter explicitement dans le Compte rendu présent le susdit état de choses et d'en donner des illustrations. C'est cette promesse que nous tenons aujourd'hui.

Les phénomènes d'accroissement perforant⁴⁾ ont été assez fré-

¹⁾ Alfred Jörgensen, Die Hefenfrage (Centralbl. f. Bakt. Par. u. Inf., 2. Abth. IV, 860 (1898)).

²⁾ Friedrich Weleminsky, Ueber Sporenbildung bei *Dematium pullulans*, de Bary (Ibid. V. 297 (1899)).

³⁾ Alb. Klöcker und H. Schiöningg, Ueber Durchwachsungen bei *Dematium pullulans*, De Bary und bei anderen Pilzen (Ibid. V, 505 (1899)).

⁴⁾ Strictement parlant ce n'est pas toujours d'un accroissement perforant (Durchwachsung) qu'il s'agit; souvent ce n'est que d'une invasion. Si généralement nous employons le terme „accroissement perforant“, c'est parce que les savants (tels que Lindner, par exemple) s'en sont servis jusqu'ici dans tous les cas.

quemment observés dans le règne végétal, aussi bien dans les types inférieurs que dans les supérieurs. En ce qui concerne spécialement les Champignons, les observations de M. Schleiden¹⁾ sont les premières dans ce sens, savoir à propos de l'*Achlya prolifera*. Voici ce qu'il en dit (*l. c.*, pp. 227—28): Un article filiforme terminal des hyphes où il s'est produit de petites spores, s'étant vidé, la cloison contiguë y en pousse généralement un nouveau qu'elle vient de former. Pringsheim²⁾ dit avoir constaté chez le *Saprolegnia ferax* qu'un hyphe peut pénétrer en croissant dans un sporange évacué et y former un oogone (*l. c.*, p. 197, pl. XVIII, fig. 5). Dans la variété *hypogyna* de cette même espèce, il a observé qu'en croissant les anthéridies pénètrent à travers la cloison dans les oogones (*l. c.*, p. 196, pl. XVIII, fig. 9 et fig. 10). Dans sa monographie du genre *Chaetomium*, Zopf³⁾ décrit et représente des chlamydospores du *Ch. Kunzeanum*, qui germent pendant qu'elles font encore partie du mycélium, après quoi les tubes germinatifs croissent à travers les cloisons transversales des cellules voisines (*l. c.*, p. 243, pl. 3 (XVI), figg. 24, 25 A, 25 B). Chez l'*Inzengæa erythrospora*, Borzi⁴⁾ constata que certaines cellules terminales vésiculaires de l'extrême couche corticale du périthécium, étaient traversées par les hyphes en voie de croissance qui les portaient (*l. c.*, p. 456, pl. XX, fig. 12). Parmi ses illustrations de l'*Endomyces Magnusii*, Ludwig⁵⁾ en donne une qui montre qu'elle aussi, cette espèce figure avec des conidies endogènes (*l. c.*, p. XXIII, pl. XVIII, fig. 7). Toutefois, c'est Lindner⁶⁾ qui a le plus approfondi la question: il décrit et figure amplement quelques phénomènes d'accroissement perforant des *Epicoccum purpurascens*, *Alternaria* sp. et *Botrytis cinerea*. Dans la première de ces espèces il constata différentes sortes du phénomène en question, et il observa souvent qu'à l'instar du *Chaetomium* de Zopf, les chlamydospores germaient avant d'avoir quitté le mycélium. Quelquefois, mais rarement, elles présen-

¹⁾ Schleiden, Grundzüge der wissenschaftlichen Botanik. 4. Aufl. Leipzig, 1861.

²⁾ N. Pringsheim, Weitere Nachträge zur Morphologie und Systematik der Saprolegniaceen (Pringsh. Jahrb. f. wissensch. Bot. IX, 191 (1873—74)).

³⁾ W. Zopf, Zur Entwicklungsgeschichte der Ascomyceten. *Chaetomium*. (Nova Acta d. Ksl. Leop.-Carol. Deutschen Akad. d. Naturf. XLII, 199 (1881)).

⁴⁾ A. Borzi, *Inzengæa*, ein neuer Ascomycet (Pringsh. Jahrb. f. wissensch. Bot. XVI, 450 (1885)).

⁵⁾ I. F. Ludwig, Ueber Alkoholführung und Schleimfluss lebender Bäume und deren Urheber (Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. IV, 17 (1886)).

⁶⁾ Paul Lindner, Ueber Durchwachsungen an Pilzmycelien (Ibid. V, 153 (1887)).

taient ce que Borzi a vu dans l'*Inzengæa* (*l. c.*, p. 158, pl. VII, fig. 10). En fig. 3 et en fig. 6, Lindner représente une cellule qui en croissant pénètre dans un filament de mycélium autre que celui dont il forme un article. En fig. 5 et en fig. 7, cet auteur montre des accroissements perforants d'*Alternaria*. Sur ce qui a lieu chez le *Botrytis cinerea*, Lindner s'exprime ainsi: „Chez le *Botrytis cinerea*, les accroissements perforants ne sont pas rares, surtout quand le mycélium est un peu vieux. Ici aussi¹⁾ le plasma se répartit diversement, et il en résulte que certaines cellules ont un contenu très abondant, tandis que d'autres sont complètement évacuées. L'apparition des accroissements perforants se relie de près au fait que les cellules qui germent à l'inté-

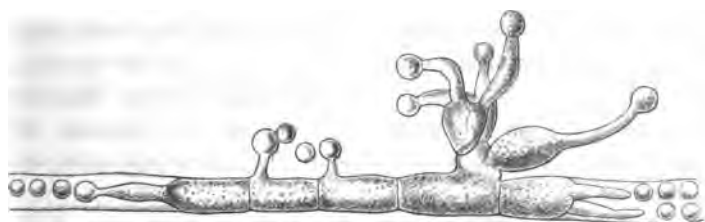


Fig. 1. *Botrytis cinerea*, Pers.

Phénomène d'accroissement perforant; formation de petites conidies (spermaties) à l'intérieur d'une cellule. (D'après P. Lindner).

rieur du vieux mycélium, sont presque exclusivement celles où abonde le protoplasma." Ceci est tout à fait identique à ce que nous avons constaté chez le *Dematium*, et nous y reviendrons plus tard.

Parmi les figures de Lindner, la 13^e de la planche VII offre un intérêt particulier; aussi l'a-t-on reproduite ci-dessus. Elle montre comment, à l'intérieur d'une cellule mycélienne, pousse un stérigme qui détache de petites conidies (spermaties). Chez l'*Endomyces Magnusii*, Brefeld²⁾ a observé des „Oïdiums endogènes“, et il en a donné une représentation (*l. c.*, p. 131, pl. I, fig. 7). Cet auteur mentionne et décrit une autre espèce des formations anormales en question de l'*Ascoidea rubescens* (*l. c.*, p. 102, pl. III B, figg. 15—19; 21—23; 25): ici, c'est la branche sporifère qui pousse dans l'ancien sporange avant que ce dernier ait évacué sa masse de spores. Un état de choses à peu près analogue à ce dernier a été constaté par M. Alb.

¹⁾ Lindner a constaté ce même fait dans l'*Epicoccum* et l'*Alternaria*.

²⁾ Oscar Brefeld, *Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie*. IX. Münster i. W., 1891.

Schmidt¹⁾ chez le *Sterigmatocystis nidulans*, dont le mycélium peut pénétrer en croissant dans une chlamydospore (*l. c.*, p. 21, figg. 25 et 26) et M. Holtermann²⁾ a fait la même observation sur l'*Ascoidea saprolegnioides*, où, à l'instar de la susdite espèce d'*Ascoidea*, la branche sporifère pénètre dans le sporange évacué, et y forme un nouveau sporange ou bien y détache des conidies (*l. c.*, p. 19, pl. II, figg. 14 b; 17—19; 21—25). Il a également constaté dans cette même espèce (*l. c.*, p. 21, pl. II, figg. 15 et 16) la formation, en cellules mycéliennes, de conidies endogènes, identiques d'aspect avec celles que nous avons observées dans le *Dematium*.

Ce qui précède constitue le contingent de la littérature à propos des phénomènes d'accroissement perforant dans les Champignons, et nous montre l'extension de ces formations: nous les trouvons chez les Saprolegniacées, les Ascoïdées et dans toute une série d'Ascomycètes, ainsi que dans divers Fungi imperfecti, et l'on ne peut guère douter qu'ils ne se retrouvent dans beaucoup d'autres Champignons. Leur nature a été plus ou moins mal comprise par plusieurs auteurs, et ces phénomènes méritent assurément plus d'attention qu'on ne leur en a accordé jusqu'ici.

Nous allons maintenant parler de nos propres recherches sur le *Dematium pullulans*, de Bary, l'*Oïdium lactis*, Fresenius, et une autre espèce d'*Oïdium* non encore décrite.

Pour nos expériences sur le *Dematium* nous avons pris différentes végétations typiques que, de temps à autre, nous avons isolées de divers fruits, et nous avons réussi à produire en toutes ces végétations les formations anormales en question.

Voici l'allure du phénomène: une cellule mycélienne, vigoureuse et pleine de plasma, se comporte comme parasite vis-à-vis de sa voisine plus faible, car, par voie de bourgeonnement, elle détache, de son extrémité tournée vers la cellule faible, des conidies qui par conséquent en arrivent à occuper l'intérieur de cette cellule affaiblie. Ainsi qu'on le voit, les choses se passent ici exactement comme le rapporte Lindner à propos du *Botrytis cinerea*. Ces conidies endogènes ainsi formées doivent donc leur origine, non pas à la cellule où elles apparaissent, mais bien à la cellule voisine.

¹⁾ Alb. Schmidt, Ueber die Bedingungen der Conidien-, Gemmen- und Schlauchfruchtproduktion bei *Sterigmatocystis nidulans*. Eid. Inaugural-Dissert. Halle a/S. 1897.

²⁾ Carl Holtermann, Mykologische Untersuchungen aus den Tropen. Berlin, 1898.

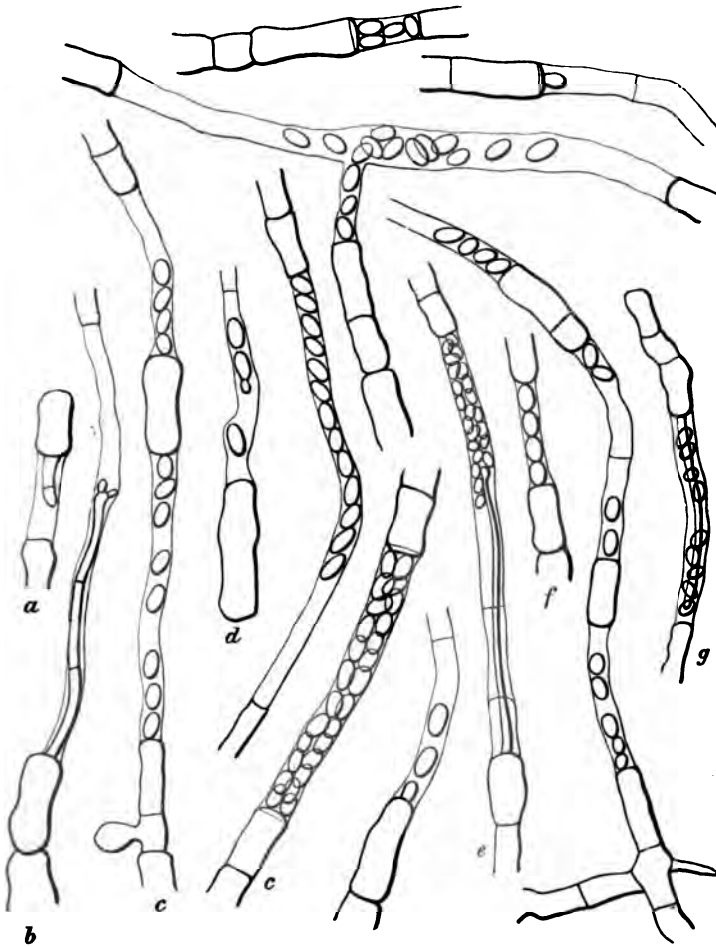


Fig. 2. *Dematium pullulans*, de Bary.

Phénomènes d'accroissement perforant et formation de conidies endogènes; *a* et *b* sont des filaments mycéliens pénétrés par la formation; en *b*, ce filament détache des conidies; *c* représente l'évolution des conidies, d'une part aux deux bouts d'une même cellule, d'autre part, celle de conidies émanant de deux cellules et pénétrant dans le même morceau de mycélium; *d*, conidie endogène en voie de détacher un bourgeon; *e*, filament de mycélium qui a perforé les cloisons de deux cellules; *f*, cellule à 4 conidies; elle ressemblait particulièrement à un sporange à 4 spores; *g* montre comment une des cellules a émis un filament de mycélium dans la cellule voisine, et une autre cellule détaché des conidies; *e* a été observé, à la température ordinaire, dans une culture en eau et datant d'un mois; toutes les autres cultures en eau, datant de 1 à 2 jours, à la température de 20° et de 25° C. Grossissement linéaire de 500 fois.

La fig. 2 ci-dessus donne plusieurs exemples d'une pareille formation de conidies endogènes. Quelques-unes des figures ont été dessinées

directement d'après l'objet préparé; d'autres d'après des photographies de préparations. Il arrive parfois que la cellule forte pousse dans la plus faible un filament mycélien plus ou moins long (fig. 2, *a, b, e, g*). Ce filament peut alors détacher des conidies (fig. 2, *b*), bien que ce cas soit assez rare. Elles aussi, les conidies logées à l'intérieur de la cellule peuvent se multiplier par bourgeonnement (fig. 2, *d*), mais ce cas aussi est moins fréquent. Si chaque extrémité d'une cellule faible est flanquée d'une cellule plus vigoureuse, ces deux cellules plus fortes peuvent envahir leur faible voisine et y détacher des conidies (fig. 2, *c*), ou bien l'une y fait entrer un filament de mycélium et l'autre y fait détacher des conidies (fig. 2, *g*). Quelquefois on peut voir les conidies pousser devant elles le peu de protoplasma contenu dans la cellule faible. L'extrémité de laquelle la cellule vigoureuse émet ses nouvelles formations, pénètre généralement sous forme de voûte dans la cellule faible. (On voit plusieurs cellules en fig. 2.) Le nombre des conidies endogènes formées de la sorte est très variable: nous en avons compté de 1 à 65 dans une cellule. Si ce nombre est petit et que les cellules soient toutes de même forme et de mêmes dimensions, on peut expliquer qu'elles se confondent avec un sporange (voir, par exemple, fig. 2, *f*), quand l'étude se borne à l'examen direct du microscope et qu'on ne poursuit pas la marche de l'évolution. Mais souvent elles varient de grandeur, et les plus récentes surtout sont les plus petites.

Ce qui précède fait déjà ressortir nettement et clairement qu'il ne s'agit point ici d'une formation d'endospores, mais bien d'une formation anormale de conidies par suite d'accroissement perforant. Toutefois nous ne nous sommes pas contentés des susdites observations, mais nous avons poursuivi l'évolution des conidies sous le microscope. C'est surtout par là que pèche le travail de Weleminsky, car il n'a pas appliqué cette méthode de recherches, qui pourtant est la seule à même de donner l'intelligence du phénomène.

Afin de pouvoir étudier l'évolution des conidies endogènes, il fallait cependant avoir une méthode capable de produire à coup sûr et avec précision le phénomène. Et c'est encore là qu'on perd son temps à chercher cette méthode dans le mémoire de Weleminsky. Veut-on produire lesdites formations, tant celles du *Dematium* que celles de l'*Oïdium*, on doit semer dans un matras Freudenreich contenant de 5 à 6 gouttes d'eau distillée stérile un peu de mycélium jeune et vigoureux, engendré par ex. dans du moût à 25° C. en un ou deux jours; on a lavé préalablement ce mycélium en l'agitant pendant quelques minutes dans environ 10^{cc} d'eau distillée stérile. Puis on place la culture à 25° C. ou à la température ordinaire. Alors, au

bout de un ou de deux jours, on constate les phénomènes en question. Ces cultures sont le point d'origine de toutes les formations reproduites en fig. 2, à l'exception de *e*, qui provient d'une pareille culture en eau, mais qui avait séjourné environ un mois à la température ordinaire. C'est peut-être à la longueur de ce séjour qu'il faut attribuer la perforation de deux cloisons par le filament de mycélium intrus.

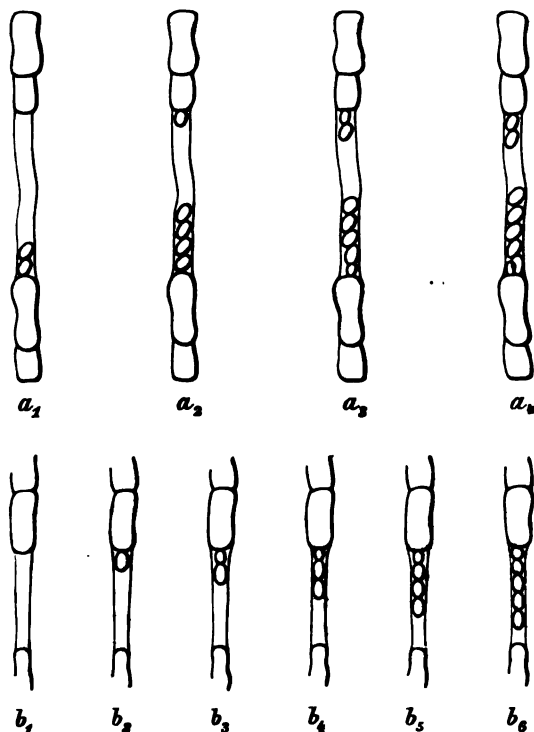


Fig. 3. *Dematium pullulans*, de Bary.

Deux séries d'évolutions de conidies endogènes, observées, dans des préparations, sous lamelle couvre-objet, de cultures en eau; *a*-série, évoluée en 5 heures, et *b* en 24 heures à 20° C. Grossissement linéaire de 500 fois.

Voici comment nous avons conduit l'étude directe au microscope. Ayant fait une culture en eau dans un matras Freudenreich à 20° C. et d'après la méthode ci-dessus décrite, nous y prélevâmes, au bout de 24 heures, une très minime quantité du mycélium et nous la plaçâmes, dans une goutte d'eau stérile, sur un verre porte-objet stérilisé, qui fut recouvert d'une lamelle couvre-objet stérilisée. Cette préparation fut alors introduite avec précaution sous le microscope, et l'on observa pas mal de conidies endogènes. Nous visâmes une cellule située sur le

bord d'une pelote de mycélium et où le phénomène ne faisait que de commencer, comme, par exemple, en a_1 de la fig. 3, où deux conidies venaient de se former. Cette cellule fut dessinée et repérée dans la préparation de manière à pouvoir être retrouvée. En même temps on fit un croquis de quelques-uns des filaments de mycélium situés dans le voisinage, là où une cellule vigoureuse et pleine de plasma était bordée d'une cellule faible et évacuée, ayant des chances pour être le lieu de production de conidies endogènes. La préparation fut ensuite placée sur une étagère sous une cloche à parois humides à la

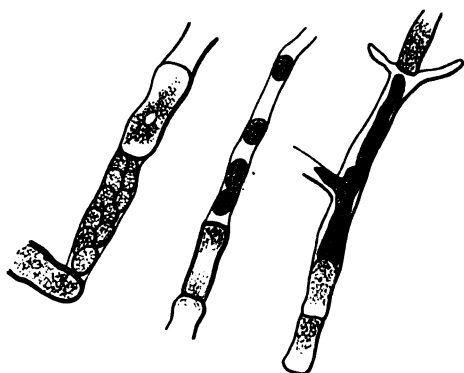


Fig. 4. *Dematium pullulans*, de Bary. Conidies endogènes et filament de mycélium, le tout d'un vert brun, provenant d'une culture en eau à la température ordinaire, datant d'environ un mois. Grossissement linéaire de 500 fois.

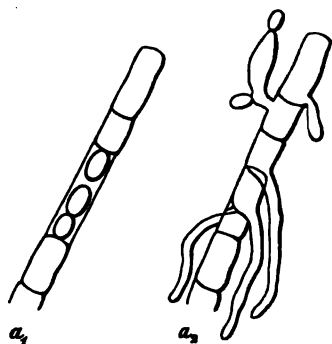


Fig. 5. *Dematium pullulans*, de Bary. Germination, en moût, de conidies endogènes dans une préparation sous lamelle couvre-objet. Au bout de 24 heures, les conidies (a_1) ont gonflé et émis des tubes germinatifs (a_2); il en est de même des deux cellules situées au haut du filament de mycélium. Grossissement linéaire de 500 fois.

température ordinaire, et on l'observa à intervalles fixes. A titre d'exemple, nous poursuivîmes l'évolution des deux séries reproduites ci-dessus en fig. 3. La série *a* eut terminé en 5 heures, mais il fallut 24 heures à la série *b*. Nous vîmes comment les conidies se détachaient des cellules vigoureuses et comment les premières conidies formées étaient poussées en avant par les plus récentes.

Bien qu'on ne puisse pas s'y méprendre en concluant de tout ce qui précède, qu'il s'agit ici de conidies et non d'endospores, nous insisterons cependant en ajoutant que, même à d'autres égards, les conidies endogènes sont tout à fait identiques aux conidies de formation normale.

On sait que ces dernières se pigmentent en vieillissant et il en est de même de celles de formation endogène. La fig. 4 présente quelques-

unes de ces conidies endogènes d'un brun verdâtre, ainsi qu'un filament de mycélium endogène et de cette couleur. Ces préparations proviennent d'une culture en eau, vieille d'un mois environ et faite à la température ordinaire. Avec l'âge, les conidies endogènes prennent aussi des parois plus épaisses, tout comme les conidies normales, qui germent, comme on le sait, non seulement par voie de bourgeonnement, mais encore à l'aide de tubes germinatifs. Ce même mode se retrouva chez les conidies endogènes; on a déjà mentionné leur bourgeonnement. La fig. 5 est l'image d'une cellule à trois conidies endogènes (α_1). Dans l'espace de 24 heures, on l'examina au microscope après l'avoir ensemencée dans du moût sur un verre porte-objet stérile, et nous vîmes alors comment ces trois conidies germaient à l'aide de tubes germinatifs traversant la paroi de la cellule qui les contenait (α_2). Nous suivîmes pour cela le même procédé qu'en observant l'évolution des conidies. On constata que les conidies les plus approchées du bord de la lamelle couvre-objet et dont, par conséquent, l'air avait largement l'accès, germaient dans le courant des premières 24 heures, en se mettant à enfler de façon à combler presque le filament de mycélium tout entier qui les contenait. Ensuite elles émirent des tubes germinatifs, de la même manière que des conidies de formation normale qui se trouvaient dans la préparation.

Si l'on transporte dans du moût un mycélium contenant les susdites formations anormales de conidies, il ne se produit, comme on devait s'y attendre, aucune fermentation, mais la simple évolution d'une végétation de *Dematium* normale et typique. Une évolution analogue a lieu sur la gélatine au moût.

En ce qui concerne les conditions de production du phénomène considéré, il est difficile de pousser plus loin les recherches à ce sujet; car l'état des choses est fort compliqué, vu qu'il s'agit précisément d'une lutte entre des cellules contiguës, non seulement à propos de la nourriture qui les entoure, mais en même temps pour la prédominance d'une cellule sur l'autre. Parmi les causes probables, nous pouvons avancer que les susdits phénomènes doivent tout d'abord leur apparition à une alimentation insuffisante. En effet, nous avons constaté qu'ils se produisaient toujours quand on employait, pour expérimenter, l'eau seulement; la fréquence existait encore, si l'eau ne contenait la nourriture qu'en faible quantité (par exemple, lorsque le mycélium était tiré de la culture en moût et n'était point lavé); mais le phénomène était d'une extrême rareté pour peu que l'ensemencement eût lieu en quelques gouttes de moût dans un matras Freudreich, c'est-à-dire dans un liquide nutritif favorable. Il y a encore une condition, c'est que le mycélium semé doit être jeune et vigoureux,

et la dernière est qu'il faut laisser l'air affluer abondamment. Plus on met d'eau dans le matras Freudenberg, plus les formations anormales en question éprouvent de difficultés à se produire. Sur les blocs de plâtre humides, ces formations eurent lieu très irrégulièrement: nous ne les avons trouvées en abondance qu'une seule fois; en d'autres cas, elles firent tout à fait défaut malgré l'identité des circonstances.

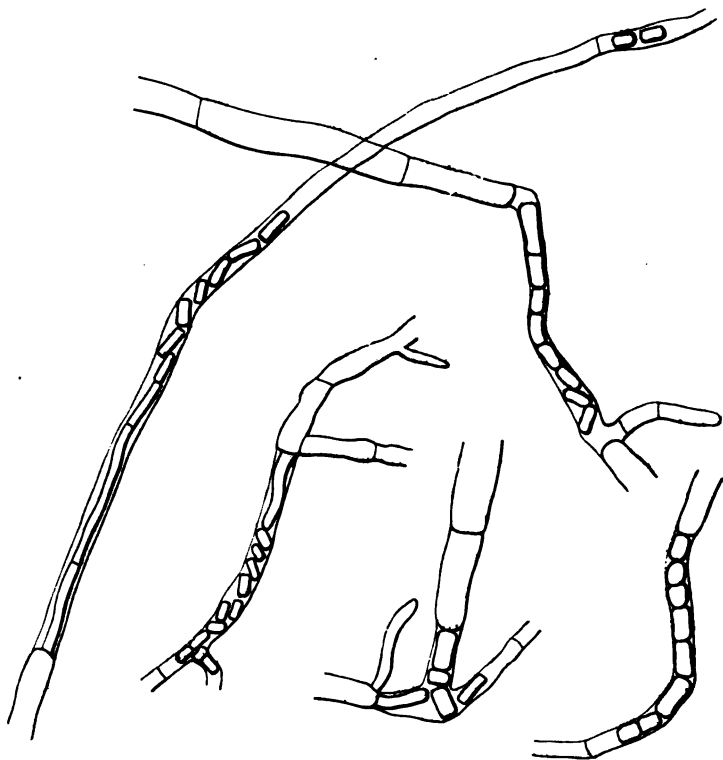


Fig. 6. *Oidium lactis*, Fresenius.
Phénomènes d'accroissement perforant et formation de conidies endogènes.
Grossissement linéaire de 500 fois.

Dans les cultures en eau en chambres Ranvier avec ou sans ventilation, ainsi que dans les chambres Böttcher, l'apparition était rare ou nulle.

Quant à l'influence de la température, nous n'avons rien constaté de régulier en opérant à 15°, 20°, 25° et 30° C., et l'évolution semble avoir lieu aussi vite à 15° qu'à 30°. Les conidies peuvent surgir rapidement, comme le prouve l'expérience dans laquelle, au bout de 5 heures, nous constatons déjà leur présence à 20° C.

Là où Weleminsky trouva le plus souvent les conidies endogènes, ce fut dans des chambres où les cultures furent desséchées, puis ré-

dans humectées. La plupart du temps, ce n'étaient que les premières générations de son ensemencement qui donnaient ce phénomène, que notre procédé, au contraire, nous permet de produire n'importe quand.

Ce même phénomène d'accroissement perforant que nous avons constaté chez le *Dematium pullulans* et décrit dans ce qui précède, nous l'avons également découvert chez l'*Oïdium lactis*, Fresenius et dans une autre espèce d'*Oïdium*. Chez l'*Oïdium*, la formation de conidies endogènes a lieu exactement de la même manière que chez le *Dematium* et dans des conditions tout à fait identiques. Dans la fig. 6 ci-dessus, on voit cette formation dans une culture en eau, vieille de 48 heures et à 25° C.

Nos recherches ont donc pour résultat que les phénomènes d'accroissement perforant ont fréquemment lieu chez le *Dematium pullulans*, de Bary et dans certaines espèces d'*Oïdium*, comme cela arrive chez tant d'autres Champignons; il se forme alors des conidies à l'intérieur de certaines cellules, et les conditions pour la formation de ces conidies est que l'alimentation soit mauvaise, l'humidité très abondante et l'air aussi. Weleminsky a donc tort de voir de vraies endospores dans ces corpuscules-là et de prétendre qu'en conséquence le *Dematium pullulans* devra désormais être compté parmi les Ascomycètes et rangé près des *Saccharomyces* et *Exoascus*. Le *Dematium pullulans* doit, comme ci-devant, être rapporté aux *Fungi imperfecti*. Nous n'avons pas mieux réussi que Weleminsky à découvrir une relation génétique entre le *Saccharomyces* et le *Dematium*.

Septembre 1900.

La formation d'enzymes dans les ferments alcooliques peut-elle servir à caractériser l'espèce?

Par

Alb. Klöcker.

Dans un mémoire intitulé *De la fermentation des saccharides* (voir *Compt. rend.* CXXVIII, 440 (1899)) M. Dubourg fait savoir que ceux des ferments alcooliques qui n'ont pas d'action inverse apparente et, par conséquent, ne sauraient se développer dans les solutions de saccharose et y déterminer une fermentation, peuvent y être amenés: en les cultivant par la méthode que voici on pourrait causer la formation de l'invertine: L'espèce de levure en question est engendrée dans un liquide nutritif riche en matière azotée (eau de levure) et où l'on a dissous 5 p. c. de glucose et 5 p. c. de sucre de canne. Quand la fermentation paraît terminée, on décante avec précaution le liquide, et lave une ou deux fois avec de l'eau stérilisée le dépôt de la levure. La levure ainsi lavée est alors introduite dans un liquide nutritif avec de la saccharose; au bout de 24 heures, cette dernière sera intervertie, et la fermentation en pleine activité. L'auteur dit en outre avoir répété cette expérience sur la galactose et qu'à l'égard des sucres étudiés, toutes les levures qu'il a essayées se sont comportées comme il a décrit plus haut. Ces sucres présentaient pourtant une exception: la lactosé, et, parmi les ferments alcooliques, le *Mucor alternans* donnèrent à l'expérience un résultat négatif. Dubourg dit en terminant: „Le fait paraît donc général pour les levures.“

L'unique manière de comprendre ce mémoire est d'y voir la prétention d'avoir découvert une méthode permettant d'amener à la facile et prompt évolution de tel ou tel enzyme les ferments alcooliques en général (et entre autres les levures: *Saccharomyces*) auxquels il manque, à l'aide d'un mode de culture déterminé. Telle a aussi été l'opinion que M. Duclaux a eue de Dubourg dans son *Traité de microbiologie*, III (1900).

En divers points, Dubourg est peu clair, et il ajoute au défaut de sa communication de ne point indiquer sur quelles espèces il a expérimenté. De plus, il laisse ignorer si les espèces qu'il a employées à ses expériences sont complètement dépourvues des enzymes que plus tard elles ont récupérés, dit-il, ou si ces enzymes y étaient déjà développés, mais en très petite quantité. En effet, pour peu que la levure en question contienne l'enzyme dont il s'agit, il n'y a rien de remarquable à ce que, pendant un certain temps, l'affaiblissement maintienne la fonction enrayée et qu'au contraire la quantité d'enzymes augmente quand la cellule reçoit un aliment fortifiant, comme dans le cas présent d'une culture en eau de levure. Mais on ne saurait en conclure que des espèces entièrement dépourvues de cet enzyme puissent devoir à une culture déterminée la faculté de développer cet enzyme. Dubourg aurait dû expérimenter sur des espèces connues, dans lesquelles on ait constaté le manque absolu de cet enzyme; ses essais y auraient gagné en clarté et on aurait pu les contrôler plus facilement. Surtout il y aurait eu toutes raisons pour étudier des espèces telles que le *Saccharomyces Marxianus*, le *Sacch. Ludwigii* ou le *Sacch. apiculatus*; d'après les recherches de nombre de savants, les deux premières espèces ne contiennent pas de maltase, et la dernière n'a ni maltase ni invertine: ces trois espèces auraient donc été d'excellents objets d'étude.

Du moment donc que Dubourg ne spécifie aucune espèce et que son mémoire entier pivote sur des expressions plus ou moins vagues (telles que „action inversaire apparente“, „il paraît que“, etc.), il n'y aurait pas eu lieu de faire des expériences de contrôle, si dans son *Traité de microbiologie*, III (1900) Duclaux n'avait adopté les résultats de Dubourg et même ne les avait érigés en loi générale, s'en servant à l'appui de l'opinion d'après laquelle les levures ne sauraient être classées d'après leur action sur les sucres. En somme, il formule le rejet des ouvrages systématiques de microbiologie, autant à propos des bactéries que des levures. Dans un compte rendu que j'ai publié précédemment au *Centralbl. f. Bakt., Parasitenk. u. Inf.*, 2. Abth. VI, 255 (1900) concernant le travail ci-dessus, j'ai, de plus, dévoilé la série de méprises qu'il a faites. Ici nous ne nous occuperons que de l'action des levures sur les sucres. Mes recherches ont de nouveau confirmé que nous sommes précisément en face de l'un des caractères les plus constants, et les recherches de Dubourg, bien loin de contredire cette assertion, n'ont fait au contraire que contribuer à l'affermir encore davantage.

Il y a déjà plusieurs années qu'au Laboratoire Carlsberg on a fait des essais pour amener des levures incapables de faire fermenter la

maltose à faire fermenter cette espèce de sucre. On a expérimenté sur le *Sacch. Marxianus*, le *Sacch. exiguus* et le *Sacch. Ludwigii*. La première de ces espèces, fut cultivée sous peu de pression de l'acide carbonique développé pendant la fermentation, dans la pensée qu'en pareilles conditions ce *Saccharomyces* serait à même d'attaquer la maltose; mais il n'en fut rien. Dans les expériences sur le *Sacch. exiguus* et le *Sacch. Ludwigii*, on pensait que peut-être les cellules des cultures en moût très anciennes seraient forcées d'attaquer la maltose faute d'autre nourriture; mais elles n'en firent rien, pas plus que leur descendance quand elle servait aux expériences. Le résultat était également négatif quand une jeune et vigoureuse végétation des deux espèces susdites était introduite dans une culture en moût à 25° C. où d'autres cellules avaient déjà enlevé les autres espèces de sucre: la maltose restante ne fut fermentée en aucun cas.

Dans ces derniers temps, on a également fait, dans notre Laboratoire, des expériences sur la culture du *Sacch. Marxianus* en eau de levure contenant 10 p. c. de maltose, et sur celle du *Sacch. apiculatus* en eau de levure contenant, soit 10 p. c. de saccharose, soit 10 p. c. de maltose; ces deux espèces furent cultivées, à 25° C., dans un tube où l'air était fortement raréfié (presque dans le vide). Au bout de dix jours, on constata que nulle part il n'y avait trace de fermentation, en sorte que, même dans les conditions ci-dessus, les deux espèces en question sont incapables de faire fermenter, le *Sacch. Marxianus* la maltose et le *Sacch. apiculatus* soit la maltose, soit la saccharose.

J'ai dirigé mes recherches sur quatre espèces qui sont toutes à la disposition des personnes désireuses de contrôler mes résultats: le *Sacch. apiculatus* et un nouveau *Saccharomyces* typique que j'ai découvert dans le tube digestif des abeilles à miel (*Apis mellifica*); de plus, les deux espèces de Hansen: *Sacch. Marxianus* et *Sacch. Ludwigii*. J'ai choisi la première de ces espèces en raison de son importance particulière, car on la trouve dans tous les laboratoires; j'y ai adjoint l'autre espèce, car c'est un *Saccharomyces* typique qui ne développe pas l'invertine; enfin l'étude du *Sacch. Marxianus* et du *Sacch. Ludwigii* était intéressante, parce qu'il s'agissait de produire l'enzyme dit maltase et de faire fermenter la maltose, sucre que Dubourg ne nomme pas expressément, il est vrai, mais qui doit être comporté par „la loi“.

Comme on devait s'y attendre, le résultat de mes recherches fut contraire à celui où était arrivé Dubourg. La connaissance de l'action des *Sacch. apiculatus*, *Sacch. Marxianus* et *Sacch. Ludwigii* sur les sucres est due, on le sait, aux recherches bien connues de M. Hansen (1881 et 1888), recherches dont la justesse a été

confirmée plus tard par d'autres investigateurs. En 1895, alors que ces espèces avaient déjà depuis longues années subi la culture dans les conditions les plus variées — tantôt en moût, tantôt en d'autres liquides nutritifs — j'ai soumis les deux premières espèces à un examen de contrôle, et montré que durant le temps considéré il n'y avait rien de changé dans leurs actions sur les deux sucres, maltose et saccharose.

A Berlin, M. Emil Fischer et ses collaborateurs ont fait des études de contrôle qui confirment également les indications de M. Hansen. En donnant aux expériences le but susdit, ils sont arrivés à des résultats négatifs. Ainsi MM. Fischer et Thierfelder ont cultivé le *Sacch. Pastorianus* I en eau de levure contenant un mélange de l-mannose et de dextrose, dans l'intention de faire fermenter la mannose; mais cette tentative échoua complètement. Les traits principaux des communications qu'on va donner, ont déjà été publiés dans une notice préliminaire faite dans le *Centralbl. f. Bakt., Parasitenk. u. Inf.*, 2. Abth. VI, 241 (1900).

Expériences sur le *Sacch. apiculatus*, Reess.

Le but était donc de faire produire à cette espèce, d'après les indications de Dubourg, l'inversion d'une solution de saccharose.

Une jeune et vigoureuse végétation, engendrée en 3 jours à 25° C. dans une solution de dextrose et de saccharose dans l'eau de levure, fut ensemencée dans de l'eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de saccharose. Abandonné à lui-même à 25° C. pendant 5 jours, le liquide fut décanté, et le dépôt de la levure lavé à l'eau stérile, à 3° C., une fois dans l'espace de quelques heures. Cette levure ainsi lavée servit à infecter un matras chargé d'eau de levure additionnée de 10 p. c. de saccharose, ainsi qu'un autre où il y avait de l'eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de saccharose, la culture devant être continuée à 25° C. La culture en solution de saccharose dans l'eau de levure fut maintenue à 25° C. et essayée chaque jour à la liqueur de Fehling pour y constater la présence du sucre interverti. Même au bout de 9 jours d'abandon, il n'y avait pas encore trace de réduction: aucune inversion n'avait donc encore eu lieu. Cette espèce ayant reçu une seconde culture en eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de saccharose durant 6 jours à 25° C., le liquide fut décanté et, sans laver le dépôt de la levure (afin de ne pas en enlever l'invertine qui aurait pu s'y former), on en ensemença une eau de levure à 10 p. c. de saccharose, qu'on laissa à 25° C.; mais là non plus l'espèce en question ne fut pas capable d'intervertir la saccharose.

Essais du *Saccharomyces n. sp.* isolé des abeilles à miel.

Dans les liquides nutritifs, les cellules de cette espèce se présentent comme rondes ou ovales, et fortement agglomérées, d'où résulte que le dépôt de la levure forme une masse cohérente. Sur gélatine au moût, ces cellules sont souvent très allongées et, au bout d'un temps assez prolongé, elles y développent des endospores en plus grandes quantités que dans les cultures sur blocs de plâtre, où parfois aucune formation de spores n'a lieu. Au début, les colonies macroscopiques sur gélatine au moût peuvent ressembler à la Pézize (*Peziza*). Cette espèce fait fermenter les solutions de dextrose, de fructose et de maltose, mais reste impuissante devant la saccharose, et n'agit que lentement sur le moût de bière.

J'ai traité cette espèce exactement de la même manière que le *Sacch. apiculatus*. Seulement, pour le lavage, après la deuxième culture en solution de dextrose-saccharose dans l'eau de levure, j'ai remplacé, par une solution de saccharose dans l'eau de levure, l'eau pure que j'avais employée après la première culture. Mais, pas plus que le *Sacch. apiculatus*, cette espèce ne put être amenée à intervertir les solutions de saccharose.

Essais du *Sacch. Marxianus*, E. Chr. Hansen.

Une végétation jeune et vigoureuse, engendrée à 25° C. en 3 jours dans un mélange de moût et d'une solution de dextrose dans l'eau de levure, fournit une semence en eau de levure où l'on avait dissous 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de maltose. Au bout de 5 jours, à 25° C., la culture ne donnait plus signe de fermentation; le liquide fut décanté, et le dépôt de la levure lavé à l'eau stérile à 3° C. une fois en quelques heures. La levure ainsi lavée futensemencée partie en eau de levure contenant 5 p. c. de maltose, partie en eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de maltose. Après 9 jours d'abandon à 25° C., il ne s'était pas produit trace d'alcool dans la solution de maltose dans l'eau de levure (pas de réaction par „larmes“, méthode Pasteur, ni de réaction à l'iodoforme à la Lieben). Le dernier matras infecté, chargé d'eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de maltose, ayant séjourné 9 jours à 25° C., le liquide fut décanté, et le dépôt de la levure lavé à l'eau stérile de la manière ci-dessus décrite. La levure lavée fut de nouveau semée dans une solution de maltose dans l'eau de levure; mais cette fois non plus il ne se forma pas d'alcool.

Le *Sacch. Marxianus* est donc incapable de faire fermenter la maltose, même après culture suivant le procédé Dubourg décrit plus haut.

Essais du Sacch. Ludwigi, E. Chr. Hansen.

Comme on le sait, cette espèce est aussi impuissante que le *Sacch. Marxianus* à faire fermenter la maltose. Une végétation jeune et vigoureuse, engendrée à 25° C. en 24 heures dans du moût, fut semée en eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de maltose, et la culture tenue à 25° C. Au bout de 4 jours, comme il n'y avait plus signe de fermentation, le liquide fut décanté et la levure rapidement lavée à l'eau stérile. Une portion de ce dépôt de levure lavé fut mise dans de l'eau de levure où l'on avait dissous 5 p. c. de maltose, et la culture fut tenue à 25° C. Au bout de 7 jours, il n'y avait encore aucun signe de fermentation; les analyses faites en vue de trouver de l'alcool donnèrent un résultat négatif, car il n'y eut pas réaction du liquide par les procédés Pasteur et Lieben. Une autre partie de ce dépôt de levure servit à continuer la culture en eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de maltose. Le dépôt de levure qui s'y produisit, fut ensuite semé, sans lavage, dans de l'eau de levure contenant 5 p. c. de maltose, et la culture laissée à la température ordinaire pendant 3 mois. Je visitai souvent cette culture pour chercher si l'on pouvait y découvrir des signes de fermentation; mais je n'en observai jamais. Au bout de ces 3 mois, le liquide ne donnait de réaction ni par les „larmes“ ni par l'iodoforme; il ne contenait donc pas d'alcool.

Dans les expériences qui précèdent, j'ai donc non seulement copié exactement le procédé Dubourg, mais l'ai même dépassé en poursuivant le traitement durant une culture de plus, et, en certains cas, j'ai opéré sans laver la levure afin de ne pas la dépouiller de l'enzyme qui aurait pu s'y former. Néanmoins, je suis toujours arrivé au résultat que voici.

Résultat:

Dubourg a tort de prétendre que les levures qui ne contiennent pas tel ou tel enzyme, peuvent être amenées à produire cet enzyme, si on les cultive d'après le procédé indiqué par lui. Par conséquent, la conclusion qu'en tire Duclaux est également fausse; il dit que l'action des ferments alcooliques sur les sucres ne peut pas servir à caractériser l'espèce. Au contraire, on a de nouveau constaté que c'est là un de nos plus constants caractères de l'espèce.

Septembre 1900.

TABLE DES MATIÈRES.

	Page
Johan Kjeldahl. Par W. Johannsen.....	1
Recherches sur le pouvoir rotatoire de quelques matières protéiques végétales. Par J. Kjeldahl	IX
Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques.	
Par Emil Chr. Hansen.....	1
X. La variation des <i>Saccharomyces</i> . (Avec 5 figures dans le texte)...	1
1. Introduction	1
2. Aperçu de mes premières recherches et nouveaux contingents à ces études.....	3
Forme des cellules, p. 3. Formation des spores et bourgeonnement, p. 9. Actions chimiques. Variations de la levure de brasserie, p. 13.	
3. Nouvelles recherches sur les variétés asporogènes.....	18
Méthodes, p. 18. Expériences faites dans les liquides nutritifs, p. 21. Expériences faites sur un milieu nutritif solide, p. 24. Sélection ou transformation? p. 26. Sur les conditions de la transformation, p. 31.	
Recherches sur les bactéries acétifiantes. (Troisième mémoire). Par Emil Chr. Hansen (Avec 1 figure dans le texte)	39
Limite de vitalité	39
De la variation	42
Phénomènes d'accroissement perforant et de formation anormale des conidies chez le <i>Dematium pullulans</i> , de Bary, et autres champignons. Par Alb. Klöcker et H. Schiønning. (Avec 6 figures dans le texte)....	47
La formation d'enzymes dans les ferments alcooliques peut-elle servir à caractériser l'espèce? Par Alb. Klöcker	58

FEF 9 113

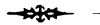
Carlsberg Laboratorium
COMPTE-RENDU

DES TRAVAUX

DU

LABORATOIRE DE CARLSBERG.

5^{ME} VOLUME, 2^{ME} LIVRAISON.



COPENHAGUE.

EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP.

IMPRIMERIE DE THIELE.

1902.

Prix: 1,50 Kr.

TP
500
C.212

Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg.

Paraît par livraisons à des époques indéterminées. A mesure qu'il en paraîtra un nombre suffisant pour faire un volume, les abonnés recevront un titre imprimé en même temps qu'une table des matières, avec l'indication de la période qu'embrasse le volume.

Essais du Sacch. Ludwigi, E. Chr. Hansen.

Comme on le sait, cette espèce est aussi impuissante que le Sacch. Marxianus à faire fermenter la maltose. Une végétation jeune et vigoureuse, engendrée à 25°C. en 24 heures dans du moût, fut semée en eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de maltose, et la culture tenue à 25°C. Au bout de 4 jours, comme il n'y avait plus signe de fermentation, le liquide fut décanté et la levure rapidement lavée à l'eau stérile. Une portion de ce dépôt de levure lavé fut mise dans de l'eau de levure où l'on avait dissous 5 p. c. de maltose, et la culture fut tenue à 25°C. Au bout de 7 jours, il n'y avait encore aucun signe de fermentation; les analyses faites en vue de trouver de l'alcool donnèrent un résultat négatif, car il n'y eut pas réaction du liquide par les procédés Pasteur et Lieben. Une autre partie de ce dépôt de levure servit à continuer la culture en eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de maltose. Le dépôt de levure qui s'y produisit, fut ensuite semé, sans lavage, dans de l'eau de levure contenant 5 p. c. de maltose, et la culture laissée à la température ordinaire pendant 3 mois. Je visitai souvent cette culture pour chercher si l'on pouvait y découvrir des signes de fermentation; mais je n'en observai jamais. Au bout de ces 3 mois, le liquide ne donnait de réaction ni par les „larmes“ ni par l'iodoforme; il ne contenait donc pas d'alcool.

Dans les expériences qui précèdent, j'ai donc non seulement copié exactement le procédé Dubourg, mais l'ai même dépassé en poursuivant le traitement durant une culture de plus, et, en certains cas, j'ai opéré sans laver la levure afin de ne pas la dépouiller de l'enzyme qui aurait pu s'y former. Néanmoins, je suis toujours arrivé au résultat que voici.

Résultat:

Dubourg a tort de prétendre que les levures qui ne contiennent pas tel ou tel enzyme, peuvent être amenées à produire cet enzyme, si on les cultive d'après le procédé indiqué par lui. Par conséquent, la conclusion qu'en tire Duclaux est également fausse; il dit que l'action des ferments alcooliques sur les sucres ne peut pas servir à caractériser l'espèce. Au contraire, on a de nouveau constaté que c'est là un de nos plus constants caractères de l'espèce.

Septembre 1900.

Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques

Par

Emil Chr. Hansen.

XI.

La spore de *Saccharomyces* devenu sporange.

Dans une communication que j'ai publiée en 1899 dans le „Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf.“, 2^{te} Abth., p. 1, j'émettais l'idée qu'il serait possible d'amener la spore de *Saccharomyces* à développer des spores dans son intérieur, en d'autres termes à devenir sporange elle-même. Ce terme se prend ici dans l'acception qui a cours actuellement, c'est-à-dire comme une désignation comprenant toutes cellules à formation de spores endogènes. Bien que l'hypothèse que j'avais avancée ait failli faire crier au paradoxe, elle est néanmoins maintenant un fait avéré dont on trouvera la démonstration dans ce qui va suivre.

Pour prouver combien mon hypothèse était fondée, j'ai eu diverses difficultés à surmonter. Comme on le sait, ce ne sont pas toutes les cellules — même des espèces à sporulation particulièrement vigoureuse — qui produisent des spores quand on les cultive à cet effet. Une autre difficulté, c'est qu'on n'est pas à même de faire cet essai d'un bout à l'autre dans une chambre humide sur la table du microscope de telle façon qu'on puisse avoir l'œil sur chaque individu en particulier: tout au contraire, aux différentes phases de l'expérience, on est obligé de transporter des cellules d'un flacon dans un autre. En conséquence, une pareille expérience ne saurait être menée à bonne fin que si pendant toute l'étendue du chemin à parcourir on est continuellement à même de distinguer les spores renflées d'avec les cellules végétatives qui se trouvent parmi elles. Quant à plusieurs espèces, cela est tout-à-fait impossible. Ici comme ailleurs dans le domaine de nos recherches, il ne suffit pas que le raisonnement soit juste: pour être sûr de réussir, il faut encore un objet qui se prête aux expériences parti-

culières dont il s'agit. J'en ai trouvé un dans la levure à sporulation vigoureuse dite *Johannisberg II*.

Voici la manière dont j'ai procédé :

Je fis la culture de la manière ordinaire, dans des flacons Freudenreich chargés de minces couches d'eau et abandonnés à la température de 25°C. Lorsqu'un grand nombre de cellules eurent développé les organes de reproduction en question (voir fig. 1 a), elles furent transportées dans des flacons analogues, mais qui contenaient une mince couche de moût de bière, et qui ont été abandonnés en certains cas à une température de 34°, dans d'autres cas à 25°C. Au bout de 4 heures, les spores commencent en général à se gonfler, et plusieurs d'entre elles prennent la forme de boudin ou de rognon, tandis que d'autres

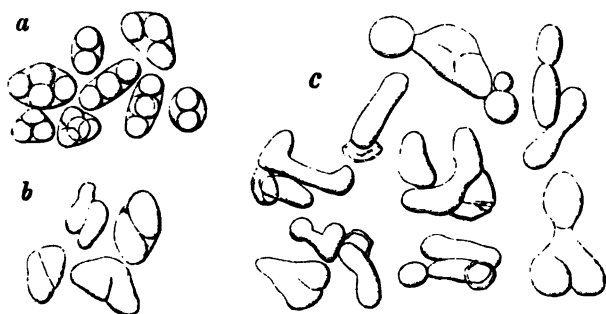


Fig. 1. *Johannisberg II*.

a, groupe de cellules à spores mûres: b, les mêmes cellules après 4 heures de culture dans une mince couche de moût à 34°C.; c, après 7 à 9 heures à 34°C. On voit surtout dans ce dernier groupe des exemples d'un fusionnement des spores; on aperçoit la paroi rompue de la cellule mère, adhérente à plusieurs des spores qu'elle renfermait. Quelques-unes de celles qui sont représentées à droite ont commencé à pousser des bourgeons. Grossissement linéaire de 1000 fois.

revêtent des formes tout-à-fait bizarres; parfois, deux ou plusieurs spores fusionnent (fig. 1 b). 3 à 5 heures après, on constate en général que la paroi de la cellule mère s'est rompue; les spores ont augmenté en grandeur, et les formes baroques sont encore plus prononcées qu'au-paravant, fig. 1 c. Arrivées à cette phase de leur développement, les spores furent enlevées au liquide nourricier et transportées dans d'autres flacons, contenant une mince couche d'une solution saturée de sulfate de chaux. D'autres expériences m'avaient fait constater, en effet, que ce liquide possède la propriété de faire cesser le bourgeonnement sans cependant arrêter la production de spores. La culture dans la solution de sulfate de chaux avait lieu à la température de 25°C. Après avoir passé de 3 à 6 jours dans ce liquide, la plupart des

spores renflées avaient elles-mêmes formé des spores dans leur intérieur. La spore était donc devenue sporange (voir fig. 2).

Les cellules végétatives qui accompagnaient les spores semées formaient, elles aussi, des endospores dans ces circonstances; mais on pouvait les distinguer des spores renflées par leur forme régulière, ronde et ovale. D'ailleurs, mon point de départ était assuré par le fait que dans beaucoup de cas, comme le montrent les figures, les spores semées étaient réunies à la membrane de la cellule mère.

La spore de *Saccharomyces* se prépare à la germination, comme c'est le cas pour les champignons en général, en absorbant des matières nutritives, qui la font gonfler. Chez l'espèce qui nous occupe ici, comme chez les *Saccharomyces* typiques en général, la spore germe en

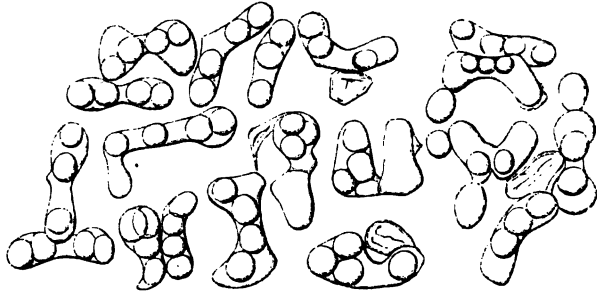


Fig. 2. Johannisberg II.

Les spores renflées représentées par la fig. 1 c ont, après 3 à 6 jours de séjour dans une solution saturée de sulfate de chaux à 25°C. formé des spores dans leur intérieur; la plupart de celles qui se trouvent représentées dans la fig. 2 sont mûres, seulement un petit nombre de cellules en renferment qui n'ont pas encore atteint leur maturité. Chez plusieurs des spores représentées au milieu et à droite, on aperçoit encore la paroi rompue de la cellule mère, et l'on y trouve également des cellules qui, avant le commencement de la sporulation, avaient poussé des bourgeons. Grossissement linéaire de 1000 fois.

poussant un ou plusieurs bourgeons. Par là, elle s'est métamorphosée en cellule de levure, et dès ce commencement de sa carrière de cellule de levure, elle peut développer des spores dans son intérieur (voir en fig. 2 quelques-unes des cellules à droite), ou bien poursuivre le bourgeonnement. Il va de soi que les spores fusionnées peuvent, elles aussi, figurer comme sporanges.

Les expériences ci-dessus mentionnées montrent d'une manière claire que le chemin de la spore à la cellule mère de spores peut être parcouru sans intervention d'aucune génération intermédiaire végétative. Elles confirment en même temps le fait, démontré ailleurs, que la formation des spores chez l'espèce en question n'est pas précédée d'une conjugaison des cellules.

Évidemment, une recherche telle que celle qui nous occupe pourra de diverses manières servir à élucider la question de savoir s'il existe ou non un acte sexuel chez les champignons, question qui a été vivement discutée en ces derniers temps. Toutefois, à l'état actuel de nos connaissances à ce sujet, des débats de cette nature ne sauraient, pour le moment, mener à des constatations de quelque importance, et voilà pourquoi je ne tâcherai pas non plus d'approfondir ici ce problème.

Il serait d'un intérêt particulier d'examiner ce qui aura lieu si l'on poursuit à travers quelques générations cette sporulation sans bourgeonnement; mais une pareille expérience présente encore plus de difficultés que celle que je viens de décrire.

On sait que la spore de *Mucor* se gonfle très fortement pendant qu'elle se prépare à la germination. Par leur faculté de figurer comme cellules de levure ainsi que par leur aspect général, ces spores renflées présentent tant de ressemblance avec la spore de *Saccharomyces* que l'on pourrait bien s'imaginer qu'elles aussi doivent être aptes à développer des spores dans leur intérieur, c'est-à-dire à se transformer en sporanges. Toutefois, les expériences que j'ai faites dans ce sens ne m'ont jamais donné qu'un résultat négatif.

Il est vrai que le phénomène que j'ai observé n'est pour le moment qu'un fait isolé; mais il ne le restera pas longtemps, je crois. On est fondé à admettre qu'il n'apparaît pas seulement chez les autres *Saccharomycètes*, mais encore ailleurs dans le vaste domaine des champignons.

Mars 1902.

spores renflées avaient elles-mêmes formé des spores dans leur intérieur. La spore était donc devenue sporange (voir fig. 2).

Les cellules végétatives qui accompagnaient les spores semées formaient, elles aussi, des endospores dans ces circonstances; mais on pouvait les distinguer des spores renflées par leur forme régulière, ronde et ovale. D'ailleurs, mon point de départ était assuré par le fait que dans beaucoup de cas, comme le montrent les figures, les spores semées étaient réunies à la membrane de la cellule mère.

La spore de *Saccharomyces* se prépare à la germination, comme c'est le cas pour les champignons en général, en absorbant des matières nutritives, qui la font gonfler. Chez l'espèce qui nous occupe ici, comme chez les *Saccharomyces* typiques en général, la spore germe en

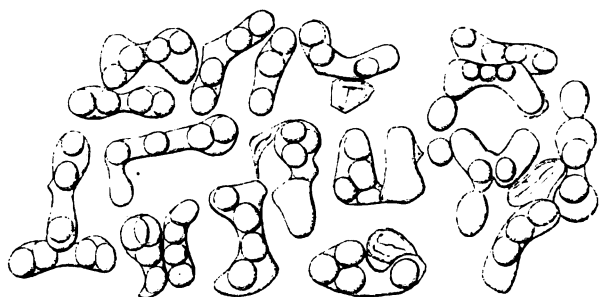


Fig. 2. Johannisberg II.

Les spores renflées représentées par la fig. 1 c ont, après 3 à 6 jours de séjour dans une solution saturée de sulfate de chaux à 25°C. formé des spores dans leur intérieur; la plupart de celles qui se trouvent représentées dans la fig. 2 sont mûres, seulement un petit nombre de cellules en renferment qui n'ont pas encore atteint leur maturité. Chez plusieurs des spores représentées au milieu et à droite, on aperçoit encore la paroi rompue de la cellule mère, et l'on y trouve également des cellules qui, avant le commencement de la sporulation, avaient poussé des bourgeons. Grossissement linéaire de 1000 fois.

poussant un ou plusieurs bourgeons. Par là, elle s'est métamorphosée en cellule de levure, et dès ce commencement de sa carrière de cellule de levure, elle peut développer des spores dans son intérieur (voir en fig. 2 quelques-unes des cellules à droite), ou bien poursuivre le bourgeonnement. Il va de soi que les spores fusionnées peuvent, elles aussi, figurer comme sporanges.

Les expériences ci-dessus mentionnées montrent d'une manière claire que le chemin de la spore à la cellule mère de spores peut être parcouru sans intervention d'aucune génération intermédiaire végétative. Elles confirment en même temps le fait, démontré ailleurs, que la formation des spores chez l'espèce en question n'est pas précédée d'une conjugaison des cellules.

Évidemment, une recherche telle que celle qui nous occupe pourra de diverses manières servir à élucider la question de savoir s'il existe ou non un acte sexuel chez les champignons, question qui a été vivement discutée en ces derniers temps. Toutefois, à l'état actuel de nos connaissances à ce sujet, des débats de cette nature ne sauraient, pour le moment, mener à des constatations de quelque importance, et voilà pourquoi je ne tâcherai pas non plus d'approfondir ici ce problème.

Il serait d'un intérêt particulier d'examiner ce qui aura lieu si l'on poursuit à travers quelques générations cette sporulation sans bourgeonnement; mais une pareille expérience présente encore plus de difficultés que celle que je viens de décrire.

On sait que la spore de *Mucor* se gonfle très fortement pendant qu'elle se prépare à la germination. Par leur faculté de figurer comme cellules de levure ainsi que par leur aspect général, ces spores renflées présentent tant de ressemblance avec la spore de *Saccharomyces* que l'on pourrait bien s'imaginer qu'elles aussi doivent être aptes à développer des spores dans leur intérieur, c'est-à-dire à se transformer en sporanges. Toutefois, les expériences que j'ai faites dans ce sens ne m'ont jamais donné qu'un résultat négatif.

Il est vrai que le phénomène que j'ai observé n'est pour le moment qu'un fait isolé; mais il ne le restera pas longtemps, je crois. On est fondé à admettre qu'il n'apparaît pas seulement chez les autres *Saccharomycètes*, mais encore ailleurs dans le vaste domaine des champignons.

Mars 1902.

XII.

Recherches comparatives sur les conditions de la croissance végétative et le développement des organes de reproduction des levures et des moisissures de la fermentation alcoolique.

1. Saccharomyces.

Aperçu de mes recherches antérieures.

Quant à la première partie de ces recherches, j'en ai fait un rapport détaillé dans le second mémoire de la présente série 1883, et j'y ai aussi rendu compte de la bibliographie de ce sujet.

La première communication relative aux conditions de la formation de spores chez les *Saccharomyces*, est due à J. de Seynes (1868). Ce savant émet l'opinion que les spores n'apparaissent que quand la culture se fait dans des conditions défectueuses d'alimentation, par exemple dans l'eau, dans des solutions fortement étendues de sucre, gomme, etc. Un peu plus tard (1869), Reess observa qu'elles peuvent aussi se développer quand les cellules végétatives sont semées sur des tranches de pommes de terre (soit crues, soit cuites) ou d'autres parties semblables de plantes, et puis cultivées dans une cloche à parois humides. Il adoptait la méthode de son prédécesseur, en ce que, dans le courant d'une quinzaine de jours, il lavait la levure, à plusieurs reprises, dans de l'eau. Quant à la température, il pensait qu'on favorise la production des spores en effectuant la culture à une température basse, soit à 8 à 10°C., ou au-dessous. Quant à la levure de bière à fermentation haute, il est d'avis que pour qu'elle puisse développer des spores il faut d'abord la transformer en levure de fermentation basse, etc.

En 1872, Engel recommanda d'employer des blocs de plâtre pour la culture de spores, ce qui constitue en quelque sorte un perfectionnement de la technique. Ses travaux ne fournirent cependant point de contribution à la compréhension des conditions et de la méthode: il n'a fait que reproduire l'erreur de ces devanciers.

Évidemment, une recherche telle que celle qui nous occupe pourra de diverses manières servir à élucider la question de savoir s'il existe ou non un acte sexuel chez les champignons, question qui a été vivement discutée en ces derniers temps. Toutefois, à l'état actuel de nos connaissances à ce sujet, des débats de cette nature ne sauraient, pour le moment, mener à des constatations de quelque importance, et voilà pourquoi je ne tâcherai pas non plus d'approfondir ici ce problème.

Il serait d'un intérêt particulier d'examiner ce qui aura lieu si l'on poursuit à travers quelques générations cette sporulation sans bourgeonnement; mais une pareille expérience présente encore plus de difficultés que celle que je viens de décrire.

On sait que la spore de *Mucor* se gonfle très fortement pendant qu'elle se prépare à la germination. Par leur faculté de figurer comme cellules de levure ainsi que par leur aspect général, ces spores renflées présentent tant de ressemblance avec la spore de *Saccharomyces* que l'on pourrait bien s'imaginer qu'elles aussi doivent être aptes à développer des spores dans leur intérieur, c'est-à-dire à se transformer en sporanges. Toutefois, les expériences que j'ai faites dans ce sens ne m'ont jamais donné qu'un résultat négatif.

Il est vrai que le phénomène que j'ai observé n'est pour le moment qu'un fait isolé; mais il ne le restera pas longtemps, je crois. On est fondé à admettre qu'il n'apparaît pas seulement chez les autres *Saccharomycètes*, mais encore ailleurs dans le vaste domaine des champignons.

Mars 1902.

telle sorte que dans les limites où les spores peuvent se produire, cela se fait lentement aux basses températures, plus vite aux températures plus élevées, jusqu'à un certain point, à partir duquel la sporulation redevient plus lente et finit bientôt par s'arrêter. J'ai aussi constaté que les points fondamentaux, notamment ceux déterminés par les températures maxima et minima, donnaient des caractères utiles pour différencier les espèces. J'ai déterminé les courbes de température de six espèces.

Mon mémoire cité plus haut rapporte aussi quelques recherches préliminaires faites sur l'influence de la température sur le bourgeonnement et qui ont notamment démontré ce fait que les températures maxima des différentes espèces ne sont pas identiques.

C'est dans mon traité sur la formation des voiles, publié en 1886 dans la même série, qu'on trouve la première communication relative aux rapports entre le bourgeonnement et la sporulation chez les *Saccharomycètes*. J'ai montré dans cette publication que le maximum de température pour le bourgeonnement dans le moût de bière est supérieur à celui du bourgeonnement à la surface du moût (la formation de voiles), et que d'un autre côté la température maxima de cette dernière formation est supérieure à celle de la production de spores. Mon analyse du *Saccharomyces cerevisiæ* I a montré en outre que la température minima de la formation des voiles est inférieure à celle de la sporulation, et les analyses des autres espèces indiquaient le même sens. La détermination de la formation des voiles est plus difficile que celle de la sporulation; aussi, comme je l'ai dit expressément dans le traité cité, les tableaux ne donnent-ils à cet égard que des valeurs approximatives. Il faut donc, pour pouvoir bien comprendre tout cet état de choses, recourir au texte qui accompagne les tableaux. La publication citée contient des courbes de température pour la formation de voiles dans les six espèces dont j'avais en 1883 déterminé les courbes de température de la sporulation. En ce qui concerne le bourgeonnement dans le moût, je n'avais alors fait que des analyses préliminaires destinées seulement à m'orienter. Les résultats définitifs et exacts, on les trouvera enregistrés dans la section suivante, qui donne mes recherches nouvelles.

Les publications précitées montrent en outre que de vieilles cellules, elles aussi, peuvent également former des spores, mais que cette sporulation s'opère avec plus de lenteur et n'atteint pas une si haute température limite que dans le cas où la végétation semée sur les blocs de plâtre se compose de cellules jeunes. J'ai démontré aussi que la sporulation n'a pas seulement lieu dans l'eau, mais encore dans des liquides nutritifs et sur des milieux nutritifs solides, par exemple sur

la gélatine mélangée de moût de bière. C'est surtout de mes expériences sur les liquides qu'il ressort combien l'aération est un facteur important pour la production de spores.

La question devait naturellement se poser, si la régularité, la loi, que mes recherches avaient démontrée dans les rapports entre les températures limites de la croissance végétative et le développement des spores chez les *Saccharomycètes* ne s'appliquait pas également aux *Champignons* en général. En dehors de mes travaux cités plus haut, on n'avait fait alors qu'une seule analyse qui pût l'indiquer, à savoir celle faite par Wiesner en 1873 du *Penicillium glaucum* (*Sitzungsber. der Akademie der Wissensch.*, Bd. LXVIII, 1. Abt. Vienne 1874). Il n'entreprend pas de tirer des conclusions générales et ne fait que décrire son analyse. Le *Penicillium glaucum* est, on le sait, un nom sous lequel on désigne plusieurs espèces et races différentes; c'est ce qui explique qu'en examinant deux de celles-ci je suis arrivé à des chiffres divergeant beaucoup de ceux donnés par Wiesner. De même que pour les *Saccharomyces*, j'arrivai à ce résultat que la température maxima de la formation du mycélium est supérieure à celle de la formation de conidies; par contre, le minimum de la température fut la même pour les deux fonctions. Dans les expériences de Wiesner, la formation de conidies s'arrêtait à 3°C., tandis que la croissance végétative se continuait à 21½°C.; par contre, dans mes expériences cette limite s'est trouvée être de 1½°C. pour l'une et l'autre de ces deux fonctions.

Dans mes „*Biologische Untersuchungen über Mist bewohnende Pilze*“ (*Botan. Ztg.*, Heft VII (1897)) j'ai fait la description de quelques expériences que j'avais faites sur l'*Anixiopsis stercoraria* à l'effet d'éclaircir la question qui nous occupe ici. La température maxima du développement du mycélium et de la formation des gemmes chez cette espèce s'est trouvée être sensiblement supérieure à celle du développement des périthèces, ce qui concordait bien avec la règle que j'avais constatée dans les *Saccharomyces*. Par suite de ces observations, j'émettais l'idée que ceci devait être vrai pour les *Champignons* en général. J'en ai fourni de nouvelles preuves dans le chapitre traitant du *Mucor*.

Dans mon mémoire précité paru en 1883, j'avais fait remarquer ce fait que dans les brasseries, distilleries et fabriques de vin on n'engendrait, à travers de longues séries d'années, que des générations de cellules végétatives, et dans un nombre excessivement élevé. Or, j'ai constaté également chez l'*Anixiopsis stercoraria* que la formation de spores manquait quand les conditions dans lesquelles ce champignon se trouvait étaient de nature à permettre une croissance végétative luxuriante et non interrompue. C'est là, en somme, un fait qu'on peut assez souvent observer dans les *Champignons*. D'un

autre côté, j'ai observé que la faculté de produire des spores n'est pas affaiblie pendant ce développement interminable de générations purement végétatives.

Chez l'*Anixiopsis stercoraria*, la formation des périthèces est précédée par le développement d'un système végétatif particulier. Voilà, en somme, un phénomène que nous sommes habitués à observer chez les Champignons. On pourrait maintenant se demander si quelque chose d'analogue a lieu dans les *Saccharomycètes* avant la formation des spores. Quand nous faisons la culture sur des blocs de plâtre ou dans des matras, nous ne saurions décider si, oui ou non, cette fonction est propre à un terme défini de l'évolution des cellules végétatives. Nous ne savons pas combien de générations ont précédé, et nous ignorons de même si, oui ou non, nous sommes ici en face d'un développement successif et nécessaire d'éléments végétatifs. Afin d'éclaircir cette importante question, il nous faut poursuivre dès le commencement jusqu'à la fin la marche de l'évolution en prenant pour point de départ une cellule unique. J'ai rendu compte des recherches que j'ai faites à ce sujet dans une communication préliminaire publiée au commencement de l'année 1899 dans le „Centralbl. f. Bakt., Parasitenk. u. Inf.“, 2^{te} Abth.

Dans l'une de ces séries d'essais j'ai expérimenté sur des cellules jeunes et vigoureuses engendrées de la manière décrite ci-dessus, dans du moût de bière; dans la seconde série les cellules provenaient de cultures en moût assez vieilles. Dans l'un et l'autre cas elles furent lavées dans l'eau distillée dans le courant de 1 à 2 heures à 2°C. Je fis la culture sur la table du microscope à 25°C. dans une chambre de Ranvier avec grand accès d'air et dans de l'eau distillée. Les cellules semées ne doivent pas donner un bourgeonnement trop abondant, parce qu'alors on ne sera pas à même de se tenir au courant de l'ordre suivant lequel se succèdent les cellules nouvellement formées; mais, d'autre part, il est nécessaire de pourvoir à des conditions favorables à la production de spores. L'expérience fut faite sur deux espèces, savoir le *Saccharomyces cerevisiae* I et le *Johannisberg* II. Les jeunes cellules se multiplièrent d'abord pendant quelque temps par bourgeonnement et formèrent des colonies; puis, elles se sont mises à produire des spores, et de telle sorte que les premières spores se formèrent dans la cellule mère de la colonie et que de celle-ci la sporulation progressa vers les membres plus jeunes de la colonie; au bout de quelques jours, je pouvais généralement constater l'apparition de spores même dans les cellules les plus jeunes. La fig. 1 ci-contre, que j'ai dessinée après avoir publié la communication précitée, montre cet état de choses. Cette expérience nous a

donc appris que la régularité se manifeste même ici et que les cellules étaient capables de former des spores directement sans bourgeonnement préalable.

Ceci s'est manifesté d'une façon encore plus évidente dans mon expérience relative aux cellules vieilles. En effet, pourvu que nous ayons choisi la vraie phase d'évolution, il se produit ici une sporulation dans un nombre plus ou moins grand et sans bourgeonnement précédent. Les deux espèces avaient atteint ce point après un laps de temps très différent: dans le *Saccharomyces cerevisiæ* I ordinairement après que la culture en moût de l'espèce en question eut séjourné 10 jours à la température ordinaire du local; chez le *Johannisberg* II, au contraire, pas même après 3 semaines, bien que d'ordinaire au

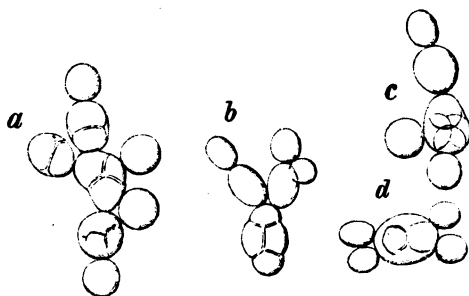


Fig. 1. *Sacch. cerevisiæ* I.

Des cellules lavées se trouvant dans de l'eau dans des chambres Ranvier au large accès d'air, au bout de 5 jours de repos à 25°C. *a*, une colonie dont la cellule mère se trouve au milieu; la cellule mère a poussé cinq bourgeons, puis formé des spores dans son intérieur; trois des cellules secondaires contiennent également des spores, l'inférieure n'étant pas encore arrivée à l'état de maturité. En *b*, *c* et *d*, ce ne sont que les cellules mères qui sont arrivées à la formation de spores; les spores de *c* et *d* ne sont pas encore mûres.

Grossissement linéaire de 1000 fois.

bout d'environ 7 semaines, dans certains cas même seulement au bout de plus de 2 mois $\frac{1}{2}$. Les cellules des voiles des deux espèces, elles aussi, formaient directement des spores dans les conditions indiquées.

J'ai montré dans la même communication que les jeunes cellules bien nourries peuvent, elles aussi, être amenées à passer sur le bourgeonnement et à former des spores immédiatement, à savoir quand elles sont placées dans des conditions favorables à la production de spores, mais défavorables au bourgeonnement. J'ai fait cet essai sur le *Johannisberg* II, dont je plaçai des cellules dans une solution aqueuse saturée de sulfate de chaux, au lieu de les placer dans de l'eau. Elles aussi, les recherches rapportées dans mon mémoire précédent et qui

firent constater que la spore peut se présenter comme sporange, démontrent le même fait.

On est venu peu à peu à se servir généralement de la méthode de culture de spores que je viens de décrire (voir p. 69); mais quant à l'importance des conditions du développement des spores, on n'était pas toujours d'accord.

Dans son traité intitulé „Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze“. III. (Jahrb. f. wissensch. Botanik, XXXV (1900)) Klebs fait mention de mes recherches et affirme d'une manière emphatique que le manque de nourriture est un facteur absolument nécessaire. En même temps il me fait le reproche de n'avoir point fait attention à l'existence de ce facteur. Ni l'un ni l'autre n'est exact. En effet, dans la méthode que je recommandais particulièrement et que j'employais dans la plupart de mes expériences, la culture se faisait, on se le rappelle, justement dans de minces couches d'eau, où par conséquent l'absence de nourriture constituait un facteur bien évident.

Cependant il va de soi que ladite absence de nourriture ne peut point constituer en elle-même une condition directe. La nourriture peut manquer, en effet, tant aux cellules elles-mêmes qu'à leur entourage sans qu'il se produise de sporulation et, inversement, — mes recherches ci-dessus mentionnées en fournissent la preuve —, des cellules bien nourries, et également des cellules qui se trouvent dans un bon milieu nourricier, sont néanmoins capables de développer ces organes de reproduction. Le manque de nourriture est assurément un facteur important quand il s'agit de faire arrêter le bourgeonnement et d'introduire par là la formation de spores: mais il n'est point le seul facteur produisant cet effet, et lorsqu'enfin les cellules se trouvent au début de la carrière de la sporulation, il faut tout un ensemble d'autres facteurs pour qu'elles puissent atteindre le but. Je mettrai tout cela en évidence dans la section traitant les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation. Il y a d'autres points encore sur lesquels mes recherches ont mené à un résultat différent de celui auquel est arrivé Klebs. On le trouve spécialement au dernier chapitre, dans lequel je traite du genre de *Mucor*.

Recherches nouvelles.

Le bourgeonnement.

Cette fonction a lieu avec plus de vigueur dans les liquides nutritifs que sur les milieux nutritifs solides. Le meilleur liquide nourricier que nous connaissions sous ce rapport, c'est le moût de bière

mentionné si souvent dans mes publications; la gélatine au moût constitue un bon milieu nourricier solide. Quant aux exigences que font les cellules au milieu nourricier pour qu'un bourgeonnement puisse se produire, elles sont, règle générale, très modestes. C'est ainsi que dans ce qui précède nous avons vu qu'elles peuvent développer des colonies entières dans de l'eau distillée. Relativement aux conditions spéciales chimiques du bourgeonnement et de la sporulation, M. le Dr Artari a commencé dans le temps des recherches au laboratoire de Carlsberg; on peut espérer le voir bientôt publier un mémoire traitant de ce sujet; je ne m'y arrêterai donc pas. D'ailleurs, les questions principales du présent mémoire se rapportent à autres choses. Pour faire les analyses que je vais décrire, MM. Klöcker et Schiönning m'ont prêté leur concours.

L'air atmosphérique joue un rôle important dans le bourgeonnement; aussi est-il généralement connu — ayant été constaté maintes fois, non seulement dans les expériences de laboratoire, mais encore dans les opérations pratiques des industries de la fermentation — que l'aération accélère la multiplication de la cellule de levure, et des expériences directes ont fait constater que cet effet est dû à l'action de l'oxygène. Quant à l'azote de l'air, il doit plutôt être considéré comme indifférent, et sa faible teneur en acide carbonique ne joue pas non plus un rôle appréciable. Le bourgeonnement peut se produire même dans les cas où il n'est pas possible de constater la présence d'oxygène libre. C'est ce que montrent les expériences sur l'azote dépourvu d'oxygène qui seront décrites dans la section suivante. Ces expériences ont été faites sur des espèces de *Saccharomyces* qui vivent plongées dans le liquide; mais les principaux résultats qu'elles ont apportés sont probablement applicables également à des espèces telles que les *Saccharomyces anomalus* et *Sacch. membranæfaciens*, qui dès le commencement de leur croissance se multiplient en formant des voiles.

Pour les expériences sur l'influence de la température, j'employai une végétation jeune et vigoureuse engendrée de la manière que j'ai décrite plus haut en parlant de la culture de spores. Je mis une semence assez abondante dans des flacons Freudenberg remplis à peu près à moitié de moût de bière. Cette culture fournit les conditions les plus favorables au bourgeonnement et a, par conséquent, servi de base à mes expériences. Des essais de contrôle furent pratiqués dans des chambres Ranvier fermées et chargées du même liquide. Pour certaines espèces le développement eut lieu ici avec un peu plus de difficulté que dans les flacons. Toutefois, les résultats principaux furent au fond les mêmes.

Comme nos recherches n'ont pas uniquement pour but de déter-

telle sorte que dans les limites où les spores peuvent se produire, cela se fait lentement aux basses températures, plus vite aux températures plus élevées, jusqu'à un certain point, à partir duquel la sporulation redevient plus lente et finit bientôt par s'arrêter. J'ai aussi constaté que les points fondamentaux, notamment ceux déterminés par les températures maxima et minima, donnaient des caractères utiles pour différencier les espèces. J'ai déterminé les courbes de température de six espèces.

Mon mémoire cité plus haut rapporte aussi quelques recherches préliminaires faites sur l'influence de la température sur le bourgeonnement et qui ont notamment démontré ce fait que les températures maxima des différentes espèces ne sont pas identiques.

C'est dans mon traité sur la formation des voiles, publié en 1886 dans la même série, qu'on trouve la première communication relative aux rapports entre le bourgeonnement et la sporulation chez les *Saccharomycètes*. J'ai montré dans cette publication que le maximum de température pour le bourgeonnement dans le moût de bière est supérieur à celui du bourgeonnement à la surface du moût (la formation de voiles), et que d'un autre côté la température maxima de cette dernière formation est supérieure à celle de la production de spores. Mon analyse du *Saccharomyces cerevisiæ* I a montré en outre que la température minima de la formation des voiles est inférieure à celle de la sporulation, et les analyses des autres espèces indiquaient le même sens. La détermination de la formation des voiles est plus difficile que celle de la sporulation; aussi, comme je l'ai dit expressément dans le traité cité, les tableaux ne donnent-ils à cet égard que des valeurs approximatives. Il faut donc, pour pouvoir bien comprendre tout cet état de choses, recourir au texte qui accompagne les tableaux. La publication citée contient des courbes de température pour la formation de voiles dans les six espèces dont j'avais en 1883 déterminé les courbes de température de la sporulation. En ce qui concerne le bourgeonnement dans le moût, je n'avais alors fait que des analyses préliminaires destinées seulement à m'orienter. Les résultats définitifs et exacts, on les trouvera enregistrés dans la section suivante, qui donne mes recherches nouvelles.

Les publications précitées montrent en outre que de vieilles cellules, elles aussi, peuvent également former des spores, mais que cette sporulation s'opère avec plus de lenteur et n'atteint pas une si haute température limite que dans le cas où la végétation semée sur les blocs de plâtre se compose de cellules jeunes. J'ai démontré aussi que la sporulation n'a pas seulement lieu dans l'eau, mais encore dans des liquides nutritifs et sur des milieux nutritifs solides, par exemple sur

la gélatine mélangée de moût de bière. C'est surtout de mes expériences sur les liquides qu'il ressort combien l'aération est un facteur important pour la production de spores.

La question devait naturellement se poser, si la régularité, la loi, que mes recherches avaient démontrée dans les rapports entre les températures limites de la croissance végétative et le développement des spores chez les Saccharomycètes ne s'appliquait pas également aux Champignons en général. En dehors de mes travaux cités plus haut, on n'avait fait alors qu'une seule analyse qui pût l'indiquer, à savoir celle faite par Wiesner en 1873 du *Penicillium glaucum* (Sitzungsber. der Akademie der Wissensch, Bd. LXVIII, 1. Abt. Vienne 1874). Il n'entreprend pas de tirer des conclusions générales et ne fait que décrire son analyse. Le *Penicillium glaucum* est, on le sait, un nom sous lequel on désigne plusieurs espèces et races différentes; c'est ce qui explique qu'en examinant deux de celles-ci je suis arrivé à des chiffres divergeant beaucoup de ceux donnés par Wiesner. De même que pour les Saccharomyces, j'arrivai à ce résultat que la température maxima de la formation du mycélium est supérieure à celle de la formation de conidies; par contre, le minimum de la température fut la même pour les deux fonctions. Dans les expériences de Wiesner, la formation de conidies s'arrêtait à 3°C., tandis que la croissance végétative se continuait à 21/2°C.; par contre, dans mes expériences cette limite s'est trouvée être de 1/2°C. pour l'une et l'autre de ces deux fonctions.

Dans mes „Biologische Untersuchungen über Mist bewohnende Pilze“ (Botan. Ztg., Heft VII (1897)) j'ai fait la description de quelques expériences que j'avais faites sur l'*Anixiopsis stercoraria* à l'effet d'éclaircir la question qui nous occupe ici. La température maxima du développement du mycélium et de la formation des gemmes chez cette espèce s'est trouvée être sensiblement supérieure à celle du développement des périthèces, ce qui concordait bien avec la règle que j'avais constatée dans les Saccharomyces. Par suite de ces observations, j'émettais l'idée que ceci devait être vrai pour les Champignons en général. J'en ai fourni de nouvelles preuves dans le chapitre traitant du Mucor.

Dans mon mémoire précité paru en 1883, j'avais fait remarquer ce fait que dans les brasseries, distilleries et fabriques de vin on n'engendrait, à travers de longues séries d'années, que des générations de cellules végétatives, et dans un nombre excessivement élevé. Or, j'ai constaté également chez l'*Anixiopsis stercoraria* que la formation de spores manquait quand les conditions dans lesquelles ce champignon se trouvait étaient de nature à permettre une croissance végétative luxuriante et non interrompue. C'est là, en somme, un fait qu'on peut assez souvent observer dans les Champignons. D'un

telle sorte que dans les limites où les spores peuvent se produire, cela se fait lentement aux basses températures, plus vite aux températures plus élevées, jusqu'à un certain point, à partir duquel la sporulation redevient plus lente et finit bientôt par s'arrêter. J'ai aussi constaté que les points fondamentaux, notamment ceux déterminés par les températures maxima et minima, donnaient des caractères utiles pour différencier les espèces. J'ai déterminé les courbes de température de six espèces.

Mon mémoire cité plus haut rapporte aussi quelques recherches préliminaires faites sur l'influence de la température sur le bourgeonnement et qui ont notamment démontré ce fait que les températures maxima des différentes espèces ne sont pas identiques.

C'est dans mon traité sur la formation des voiles, publié en 1886 dans la même série, qu'on trouve la première communication relative aux rapports entre le bourgeonnement et la sporulation chez les *Saccharomycètes*. J'ai montré dans cette publication que le maximum de température pour le bourgeonnement dans le moût de bière est supérieur à celui du bourgeonnement à la surface du moût (la formation de voiles), et que d'un autre côté la température maxima de cette dernière formation est supérieure à celle de la production de spores. Mon analyse du *Saccharomyces cerevisiae* I a montré en outre que la température minima de la formation des voiles est inférieure à celle de la sporulation, et les analyses des autres espèces indiquaient le même sens. La détermination de la formation des voiles est plus difficile que celle de la sporulation; aussi, comme je l'ai dit expressément dans le traité cité, les tableaux ne donnent-ils à cet égard que des valeurs approximatives. Il faut donc, pour pouvoir bien comprendre tout cet état de choses, recourir au texte qui accompagne les tableaux. La publication citée contient des courbes de température pour la formation de voiles dans les six espèces dont j'avais en 1883 déterminé les courbes de température de la sporulation. En ce qui concerne le bourgeonnement dans le moût, je n'avais alors fait que des analyses préliminaires destinées seulement à m'orienter. Les résultats définitifs et exacts, on les trouvera enregistrés dans la section suivante, qui donne mes recherches nouvelles.

Les publications précitées montrent en outre que de vieilles cellules, elles aussi, peuvent également former des spores, mais que cette sporulation s'opère avec plus de lenteur et n'atteint pas une si haute température limite que dans le cas où la végétation semée sur les blocs de plâtre se compose de cellules jeunes. J'ai démontré aussi que la sporulation n'a pas seulement lieu dans l'eau, mais encore dans des liquides nutritifs et sur des milieux nutritifs solides, par exemple sur

la gélatine mélangée de moût de bière. C'est surtout de mes expériences sur les liquides qu'il ressort combien l'aération est un facteur important pour la production de spores.

La question devait naturellement se poser, si la régularité, la loi, que mes recherches avaient démontrée dans les rapports entre les températures limites de la croissance végétative et le développement des spores chez les *Saccharomycètes* ne s'appliquait pas également aux *Champignons* en général. En dehors de mes travaux cités plus haut, on n'avait fait alors qu'une seule analyse qui pût l'indiquer, à savoir celle faite par Wiesner en 1873 du *Penicillium glaucum* (*Sitzungsber. der Akademie der Wissensch.*, Bd. LXVIII, 1. Abt. Vienne 1874). Il n'entreprend pas de tirer des conclusions générales et ne fait que décrire son analyse. Le *Penicillium glaucum* est, on le sait, un nom sous lequel on désigne plusieurs espèces et races différentes; c'est ce qui explique qu'en examinant deux de celles-ci je suis arrivé à des chiffres divergeant beaucoup de ceux donnés par Wiesner. De même que pour les *Saccharomyces*, j'arrivai à ce résultat que la température maxima de la formation du mycélium est supérieure à celle de la formation de conidies; par contre, le minimum de la température fut la même pour les deux fonctions. Dans les expériences de Wiesner, la formation de conidies s'arrêtait à 3°C., tandis que la croissance végétative se continuait à 21/2°C.; par contre, dans mes expériences cette limite s'est trouvée être de 1/2°C. pour l'une et l'autre de ces deux fonctions.

Dans mes „*Biologische Untersuchungen über Mist bewohnende Pilze*“ (*Botan. Ztg.*, Heft VII (1897)) j'ai fait la description de quelques expériences que j'avais faites sur l'*Anixiopsis stercoraria* à l'effet d'éclaircir la question qui nous occupe ici. La température maxima du développement du mycélium et de la formation des gemmes chez cette espèce s'est trouvée être sensiblement supérieure à celle du développement des périthèces, ce qui concordait bien avec la règle que j'avais constatée dans les *Saccharomyces*. Par suite de ces observations, j'émettais l'idée que ceci devait être vrai pour les *Champignons* en général. J'en ai fourni de nouvelles preuves dans le chapitre traitant du *Mucor*.

Dans mon mémoire précité paru en 1883, j'avais fait remarquer ce fait que dans les brasseries, distilleries et fabriques de vin on n'engendrait, à travers de longues séries d'années, que des générations de cellules végétatives, et dans un nombre excessivement élevé. Or, j'ai constaté également chez l'*Anixiopsis stercoraria* que la formation de spores manquait quand les conditions dans lesquelles ce champignon se trouvait étaient de nature à permettre une croissance végétative luxuriante et non interrompue. C'est là, en somme, un fait qu'on peut assez souvent observer dans les *Champignons*. D'un

autre côté, j'ai observé que la faculté de produire des spores n'est pas affaiblie pendant ce développement interminable de générations purement végétatives.

Chez l'*Anixiopsis stercoraria*, la formation des périthèces est précédée par le développement d'un système végétatif particulier. Voilà, en somme, un phénomène que nous sommes habitués à observer chez les Champignons. On pourrait maintenant se demander si quelque chose d'analogue a lieu dans les *Saccharomycètes* avant la formation des spores. Quand nous faisons la culture sur des blocs de plâtre ou dans des matras, nous ne saurions décider si, oui ou non, cette fonction est propre à un terme défini de l'évolution des cellules végétatives. Nous ne savons pas combien de générations ont précédé, et nous ignorons de même si, oui ou non, nous sommes ici en face d'un développement successif et nécessaire d'éléments végétatifs. Afin d'éclaircir cette importante question, il nous faut poursuivre dès le commencement jusqu'à la fin la marche de l'évolution en prenant pour point de départ une cellule unique. J'ai rendu compte des recherches que j'ai faites à ce sujet dans une communication préliminaire publiée au commencement de l'année 1899 dans le „Centralbl. f. Bakt., Parasitenk. u. Inf.“, 2^{te} Abth.

Dans l'une de ces séries d'essais j'ai expérimenté sur des cellules jeunes et vigoureuses engendrées de la manière décrite ci-dessus, dans du moût de bière; dans la seconde série les cellules provenaient de cultures en moût assez vieilles. Dans l'un et l'autre cas elles furent lavées dans l'eau distillée dans le courant de 1 à 2 heures à 2°C. Je fis la culture sur la table du microscope à 25°C. dans une chambre de Ranvier avec grand accès d'air et dans de l'eau distillée. Les cellules semées ne doivent pas donner un bourgeonnement trop abondant, parce qu'alors on ne sera pas à même de se tenir au courant de l'ordre suivant lequel se succèdent les cellules nouvellement formées; mais, d'autre part, il est nécessaire de pourvoir à des conditions favorables à la production de spores. L'expérience fut faite sur deux espèces, savoir le *Saccharomyces cerevisiae* I et le *Johannisberg* II. Les jeunes cellules se multiplièrent d'abord pendant quelque temps par bourgeonnement et formèrent des colonies; puis, elles se sont mises à produire des spores, et de telle sorte que les premières spores se formèrent dans la cellule mère de la colonie et que de celle-ci la sporulation progressa vers les membres plus jeunes de la colonie; au bout de quelques jours, je pouvais généralement constater l'apparition de spores même dans les cellules les plus jeunes. La fig. 1 ci-contre, que j'ai dessinée après avoir publié la communication précitée, montre cet état de choses. Cette expérience nous a

donc appris que la régularité se manifeste même ici et que les cellules étaient capables de former des spores directement sans bourgeonnement préalable.

Ceci s'est manifesté d'une façon encore plus évidente dans mon expérience relative aux cellules vieilles. En effet, pourvu que nous ayons choisi la vraie phase d'évolution, il se produit ici une sporulation dans un nombre plus ou moins grand et sans bourgeonnement précédent. Les deux espèces avaient atteint ce point après un laps de temps très différent: dans le *Saccharomyces cerevisiæ* I ordinairement après que la culture en moût de l'espèce en question eut séjourné 10 jours à la température ordinaire du local; chez le *Johannisberg* II, au contraire, pas même après 3 semaines, bien que d'ordinaire au

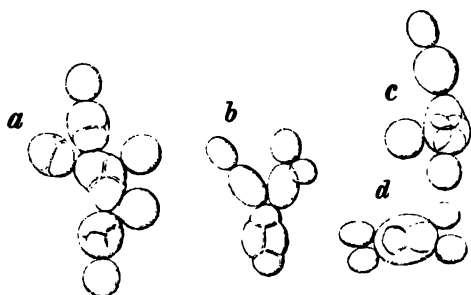


Fig. 1. *Sacch. cerevisiæ* I.

Des cellules lavées se trouvant dans de l'eau dans des chambres Ranvier au large accès d'air, au bout de 5 jours de repos à 25°C. a. une colonie dont la cellule mère se trouve au milieu; la cellule mère a poussé cinq bourgeons, puis formé des spores dans son intérieur; trois des cellules secondaires contiennent également des spores, l'inférieure n'étant pas encore arrivée à l'état de maturité. En b, c et d, ce ne sont que les cellules mères qui sont arrivées à la formation de spores; les spores de c et d ne sont pas encore mûres.

Grossissement linéaire de 1000 fois.

bout d'environ 7 semaines, dans certains cas même seulement au bout de plus de 2 mois $\frac{1}{2}$. Les cellules des voiles des deux espèces, elles aussi, formaient directement des spores dans les conditions indiquées.

J'ai montré dans la même communication que les jeunes cellules bien nourries peuvent, elles aussi, être amenées à passer sur le bourgeonnement et à former des spores immédiatement, à savoir quand elles sont placées dans des conditions favorables à la production de spores, mais défavorables au bourgeonnement. J'ai fait cet essai sur le *Johannisberg* II, dont je plaçai des cellules dans une solution aqueuse saturée de sulfate de chaux, au lieu de les placer dans de l'eau. Elles aussi, les recherches rapportées dans mon mémoire précédent et qui

firent constater que la spore peut se présenter comme sporange, démontrent le même fait.

On est venu peu à peu à se servir généralement de la méthode de culture de spores que je viens de décrire (voir p. 69); mais quant à l'importance des conditions du développement des spores, on n'était pas toujours d'accord.

Dans son traité intitulé „Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze“. III. (Jahrb. f. wissensch. Botanik, XXXV (1900)) Klebs fait mention de mes recherches et affirme d'une manière emphatique que le manque de nourriture est un facteur absolument nécessaire. En même temps il me fait le reproche de n'avoir point fait attention à l'existence de ce facteur. Ni l'un ni l'autre n'est exact. En effet, dans la méthode que je recommandais particulièrement et que j'employais dans la plupart de mes expériences, la culture se faisait, on se le rappelle, justement dans de minces couches d'eau, où par conséquent l'absence de nourriture constituait un facteur bien évident.

Cependant il va de soi que ladite absence de nourriture ne peut point constituer en elle-même une condition directe. La nourriture peut manquer, en effet, tant aux cellules elles-mêmes qu'à leur entourage sans qu'il se produise de sporulation et, inversement, — mes recherches ci-dessus mentionnées en fournissent la preuve —, des cellules bien nourries, et également des cellules qui se trouvent dans un bon milieu nourricier, sont néanmoins capables de développer ces organes de reproduction. Le manque de nourriture est assurément un facteur important quand il s'agit de faire arrêter le bourgeonnement et d'introduire par là la formation de spores: mais il n'est point le seul facteur produisant cet effet, et lorsqu'enfin les cellules se trouvent au début de la carrière de la sporulation, il faut tout un ensemble d'autres facteurs pour qu'elles puissent atteindre le but. Je mettrai tout cela en évidence dans la section traitant les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation. Il y a d'autres points encore sur lesquels mes recherches ont mené à un résultat différent de celui auquel est arrivé Klebs. On le trouve spécialement au dernier chapitre, dans lequel je traite du genre de Mucor.

Recherches nouvelles.

Le bourgeonnement.

Cette fonction a lieu avec plus de vigueur dans les liquides nutritifs que sur les milieux nutritifs solides. Le meilleur liquide nourricier que nous connaissions sous ce rapport, c'est le moût de bière

mentionné si souvent dans mes publications; la gélatine au moût constitue un bon milieu nourricier solide. Quant aux exigences que font les cellules au milieu nourricier pour qu'un bourgeonnement puisse se produire, elles sont, règle générale, très modestes. C'est ainsi que dans ce qui précède nous avons vu qu'elles peuvent développer des colonies entières dans de l'eau distillée. Relativement aux conditions spéciales chimiques du bourgeonnement et de la sporulation, M. le Dr Artari a commencé dans le temps des recherches au laboratoire de Carlsberg; on peut espérer le voir bientôt publier un mémoire traitant de ce sujet; je ne m'y arrêterai donc pas. D'ailleurs, les questions principales du présent mémoire se rapportent à autres choses. Pour faire les analyses que je vais décrire, MM. Klöcker et Schiønning m'ont prêté leur concours.

L'air atmosphérique joue un rôle important dans le bourgeonnement; aussi est-il généralement connu — ayant été constaté maintes fois, non seulement dans les expériences de laboratoire, mais encore dans les opérations pratiques des industries de la fermentation — que l'aération accélère la multiplication de la cellule de levure, et des expériences directes ont fait constater que cet effet est dû à l'action de l'oxygène. Quant à l'azote de l'air, il doit plutôt être considéré comme indifférent, et sa faible teneur en acide carbonique ne joue pas non plus un rôle appréciable. Le bourgeonnement peut se produire même dans les cas où il n'est pas possible de constater la présence d'oxygène libre. C'est ce que montrent les expériences sur l'azote dépourvu d'oxygène qui seront décrites dans la section suivante. Ces expériences ont été faites sur des espèces de *Saccharomyces* qui vivent plongées dans le liquide; mais les principaux résultats qu'elles ont apportés sont probablement applicables également à des espèces telles que les *Saccharomyces anomalus* et *Sacch. membranæfaciens*, qui dès le commencement de leur croissance se multiplient en formant des voiles.

Pour les expériences sur l'influence de la température, j'employai une végétation jeune et vigoureuse engendrée de la manière que j'ai décrite plus haut en parlant de la culture de spores. Je mis une semence assez abondante dans des flacons Freudenreich remplis à peu près à moitié de moût de bière. Cette culture fournit les conditions les plus favorables au bourgeonnement et a, par conséquent, servi de base à mes expériences. Des essais de contrôle furent pratiqués dans des chambres Ranvier fermées et chargées du même liquide. Pour certaines espèces le développement eut lieu ici avec un peu plus de difficulté que dans les flacons. Toutefois, les résultats principaux furent au fond les mêmes.

Comme nos recherches n'ont pas uniquement pour but de déter-

firent constater que la spore peut se présenter comme sporange, démontrent le même fait.

On est venu peu à peu à se servir généralement de la méthode de culture de spores que je viens de décrire (voir p. 69); mais quant à l'importance des conditions du développement des spores, on n'était pas toujours d'accord.

Dans son traité intitulé „Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze“. III. (Jahrb. f. wissensch. Botanik, XXXV (1900)) Klebs fait mention de mes recherches et affirme d'une manière emphatique que le manque de nourriture est un facteur absolument nécessaire. En même temps il me fait le reproche de n'avoir point fait attention à l'existence de ce facteur. Ni l'un ni l'autre n'est exact. En effet, dans la méthode que je recommandais particulièrement et que j'employais dans la plupart de mes expériences, la culture se faisait, on se le rappelle, justement dans de minces couches d'eau, où par conséquent l'absence de nourriture constituait un facteur bien évident.

Cependant il va de soi que ladite absence de nourriture ne peut point constituer en elle-même une condition directe. La nourriture peut manquer, en effet, tant aux cellules elles-mêmes qu'à leur entourage sans qu'il se produise de sporulation et, inversement, — mes recherches ci-dessus mentionnées en fournissent la preuve —, des cellules bien nourries, et également des cellules qui se trouvent dans un bon milieu nourricier, sont néanmoins capables de développer ces organes de reproduction. Le manque de nourriture est assurément un facteur important quand il s'agit de faire arrêter le bourgeonnement et d'introduire par là la formation de spores; mais il n'est point le seul facteur produisant cet effet, et lorsqu'enfin les cellules se trouvent au début de la carrière de la sporulation, il faut tout un ensemble d'autres facteurs pour qu'elles puissent atteindre le but. Je mettrai tout cela en évidence dans la section traitant les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation. Il y a d'autres points encore sur lesquels mes recherches ont mené à un résultat différent de celui auquel est arrivé Klebs. On le trouve spécialement au dernier chapitre, dans lequel je traite du genre de *Mucor*.

Recherches nouvelles.

Le bourgeonnement.

Cette fonction a lieu avec plus de vigueur dans les liquides nutritifs que sur les milieux nutritifs solides. Le meilleur liquide nourricier que nous connaissions sous ce rapport, c'est le moût de bière

mentionné si souvent dans mes publications; la gélatine au moût constitue un bon milieu nourricier solide. Quant aux exigences que font les cellules au milieu nourricier pour qu'un bourgeonnement puisse se produire, elles sont, règle générale, très modestes. C'est ainsi que dans ce qui précède nous avons vu qu'elles peuvent développer des colonies entières dans de l'eau distillée. Relativement aux conditions spéciales chimiques du bourgeonnement et de la sporulation, M. le Dr Artari a commencé dans le temps des recherches au laboratoire de Carlsberg; on peut espérer le voir bientôt publier un mémoire traitant de ce sujet; je ne m'y arrêterai donc pas. D'ailleurs, les questions principales du présent mémoire se rapportent à autres choses. Pour faire les analyses que je vais décrire, MM. Klöcker et Schiønning m'ont prêté leur concours.

L'air atmosphérique joue un rôle important dans le bourgeonnement; aussi est-il généralement connu — ayant été constaté maintes fois, non seulement dans les expériences de laboratoire, mais encore dans les opérations pratiques des industries de la fermentation — que l'aération accélère la multiplication de la cellule de levure, et des expériences directes ont fait constater que cet effet est dû à l'action de l'oxygène. Quant à l'azote de l'air, il doit plutôt être considéré comme indifférent, et sa faible teneur en acide carbonique ne joue pas non plus un rôle appréciable. Le bourgeonnement peut se produire même dans les cas où il n'est pas possible de constater la présence d'oxygène libre. C'est ce que montrent les expériences sur l'azote dépourvu d'oxygène qui seront décrites dans la section suivante. Ces expériences ont été faites sur des espèces de *Saccharomyces* qui vivent plongées dans le liquide; mais les principaux résultats qu'elles ont apportés sont probablement applicables également à des espèces telles que les *Saccharomyces anomalus* et *Sacch. membranæfaciens*, qui dès le commencement de leur croissance se multiplient en formant des voiles.

Pour les expériences sur l'influence de la température, j'employai une végétation jeune et vigoureuse engendrée de la manière que j'ai décrite plus haut en parlant de la culture de spores. Je mis une semence assez abondante dans des flacons Freudenreich remplis à peu près à moitié de moût de bière. Cette culture fournit les conditions les plus favorables au bourgeonnement et a, par conséquent, servi de base à mes expériences. Des essais de contrôle furent pratiqués dans des chambres Ranvier fermées et chargées du même liquide. Pour certaines espèces le développement eut lieu ici avec un peu plus de difficulté que dans les flacons. Toutefois, les résultats principaux furent au fond les mêmes.

Comme nos recherches n'ont pas uniquement pour but de déter-

miner les températures limites du bourgeonnement, mais encore de faire une comparaison entre celles-ci et les températures limites de la sporulation, il faut aussi faire la culture dans les mêmes conditions que pour cette dernière fonction. C'est pourquoi une série des essais de bourgeonnement fut faite dans de minces couches d'eau et dans les flacons et chambres mentionnés ci-dessus. Aux températures élevées, les cultures étaient abandonnées à une atmosphère humide afin d'empêcher l'évaporation. Voici les températures limites trouvées par la culture en moût:

Sacch. cerevisiæ I:	maximum de la tempér.	40°;	minimum de temp.	3—1° C.
S. Pastorianus I:	—	34°;	—	1/2° -
S. Pastorianus II:	—	40°;	—	1/2° -
S. Pastorianus III:	—	39—40°;	—	1/2° -
S. ellipsoideus I:	—	40—41°;	—	1/2° -
S. ellipsoideus II:	—	40°;	—	1/2° -
S. Marxianus:	—	46—47°;	—	1/2° -
S. anomalus:	—	37—38°;	—	1—1/2° -
S. membranæfaciens:	—	35—36°;	—	1/2° -
S. Ludwigii:	—	37—38°;	—	3—1° -
Johannisberg II:	—	37—38°;	—	1/2° -

Les températures maxima des onze espèces examinées varient de 47° à 34° C., les minima de 3 à 1/2° C., étant pour la plupart des espèces voisins de 1/2° C.

Les résultats qu'ont apportés ces expériences nous montrent d'une manière bien nette que les diverses espèces ont des températures limites différentes, et ils nous fournissent de nouveaux contingents à leur caractérisation. Il saute aux yeux que le *Sacch. Pastorianus* I occupe une place à part vis-à-vis des deux autres espèces du même groupe. La plus haute température maxima se trouve chez le *Sacch. Marxianus*; cette espèce dépasse sous ce rapport de beaucoup toutes les autres. Les deux espèces dont la température maxima est la plus élevée sont l'une et l'autre des levures de fermentation basse. Il appert donc de nouveau — j'ai fait cette constatation déjà auparavant — qu'on a tort de vouloir établir la règle que les levures de fermentation haute se développeraient à des températures plus élevées que celles de fermentation basse.

Parmi les espèces ci-dessus mentionnées, les *Sacch. anomalus* et *Sacch. membranæfaciens* sont du nombre de celles qui dans des conditions normales forment rapidement des voiles à la surface des liquides dans lesquels elles sont cultivées; toutefois cela ne se produit pas dans le voisinage des températures limites, où, par contre, elles ne se multiplient que comme levure de dépôt.

En plusieurs endroits de mes publications, j'ai eu l'occasion de

donner des exemples du pouvoir morphogénique qu'a la température dans les levures et les bactéries acétifiantes. Les expériences que je viens de communiquer fournissent une nouvelle contribution à l'élucidation de ce sujet. Elles ont montré que dans la culture des *Saccharomyces* typiques en moût près de la température maxima il apparaît des caractères morphologiques grâce auxquels on peut classer les diverses espèces dans deux séries différentes, dont l'une comprend les *Sacch. cerevisiae* I, *Sacch. Pastorianus* II et III, *Sacch. ellipsoïdeus* I et II, et enfin *Sacch. Marxianus*, tandis que la seconde renferme les *Sacch. Pastorianus* I et *Johannisberg* II. Les espèces de la première de ces deux séries développent des végétations composées de cellules rondes et ovales; ainsi les *Sacch. Pastorianus* II et III ont donc aux hautes températures entièrement changé de forme, et les autres espèces de cette série ont subi un rehaussement tout particulier de la forme typique propre aux *Sacch. cerevisiae* et *Sacch. ellipsoïdeus*. Dans les circonstances analogues les deux espèces de la seconde série: les *Sacch. Pastorianus* I et *Johannisberg* II, développent par contre des cellules en forme de boudin et allongées. Ainsi, le *Sacch. Pastorianus* I se comporte aussi sous ce rapport tout-à-fait différemment des *Sacch. Pastorianus* II et III, et quant au *Johannisberg* II c'est une transformation de la forme typique représentée dans la semence qui a eu lieu. Cette espèce est une véritable levure de vin, et se rapproche d'ailleurs des *Sacch. ellipsoïdeus* I et II, avec lesquels elle concorde également pour la forme des cellules quand la culture se fait à la température ordinaire ou autour de l'optimum. Dans le cours de la culture aux hautes températures, ses cellules ont pris une forme tout-à-fait différente de celles des deux autres espèces. Comme ces recherches ne se rattachent pas pleinement aux buts principaux de ce traité, je n'y insisterai plus. Une communication plus détaillée relative à la valeur de ces nouveaux caractères, accompagnée d'illustrations, sera publiée dans un mémoire ultérieur. Plus nous approfondissons la biologie de ces organismes, plus nous découvrons de caractères permettant de distinguer nettement les espèces entre elles.

Une comparaison du tableau ci-dessus avec mon aperçu des températures limites de la sporulation (p. 83) fait voir que la température maxima du bourgeonnement est supérieure, dans toutes les espèces, et que la température minima est inférieure, aux températures respectivement maxima et minima de la sporulation. La culture en eau distillée a donné le même résultat principal. Toutefois, dans ces derniers cas les espèces ont des températures maxima inférieures et des températures minima supérieures à celles qu'on constate dans les cultures en

moût. Du reste, les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation seront examinés dans les deux sections qui suivent.

La formation de spores.

Les conditions d'alimentation qui sont généralement favorables aux bourgeonnement des cellules le sont également quand il s'agit de les amener à un état qui leur fournisse les meilleures conditions d'une vigoureuse production de spores. Quant à la manière dont cette culture est réalisée, j'en ai déjà parlé dans la première section; nous allons envisager maintenant l'influence de l'air et de la température.

Suivant Klebs, l'air et son oxygène n'exercent guère d'influence essentielle sur la formation des spores. Toutefois, il conserve une certaine réserve en ce qu'il fait ressortir qu'on n'a pas encore fait de recherches spéciales dans ce sens. Cependant, mes publications antérieures contiennent quelques essais préliminaires sur ce sujet, qui lui ont échappé et auxquels je vais suppléer dans la suite. Ces expériences nouvelles furent faites dans des liquides et dans des flacons Freudenreich. Ce procédé est mieux approprié aux questions dont il s'agit que les cultures sur blocs de plâtre. Rien qu'à faire une culture comparée de spores dans de minces et dans d'épaisses couches de liquide, on ne tardera pas à apercevoir la grande importance de l'aération. On peut se servir à cet effet tant de liquides nutritifs que d'eau distillée. Je décrirai maintenant les plus importantes de mes expériences de l'un et de l'autre genre.

De jeunes cellules du *Sacch. Pastorianus* I et du *Johannisberg* II furent semées dans du moût de bière renfermé dans des flacons Freudenreich à la température de 25°C. Dans l'une des deux séries d'expériences les flacons furent remplis (15^{cc} de liquide, à la hauteur de 45^{mm}), tandis que dans l'autre on ne mit que 7 gouttes dans chacun d'eux. Afin d'empêcher l'évaporation, le tube surmontant le capuchon était mis en communication avec un tube courbé. Les deux séries ne différaient l'une de l'autre qu'en ce que dans la première on expérimentait avec des couches épaisses de liquide, tandis que dans la seconde elles étaient très minces. Après quelques jours, les deux espèces avaient développé des spores dans les couches minces de liquide, tandis que dans les couches épaisses les spores faisaient défaut même après plus d'un mois. De petites quantités de liquide prises dans les flacons chargés d'épaisses couches et renfermant les cellules qu'on y avait semées furent transportées dans des flacons vides, qui furent ensuite, eux aussi, laissés en repos à une température de 25°C. Or, au bout de moins de 14 jours, je pus constater un développement de spores dans tous ces flacons. Dans tous les cas, l'accès plus libre de

l'air avait pour effet la formation de spores, tandis que dans les cas où l'aération manquait, elle n'avait pas lieu. Je pouvais constater, en outre, que les cellules vieilles ont de plus grandes exigences relativement à l'aération que les jeunes. D'autres essais, qui furent faits de la même manière, mais au moyen des chambres humides, donnèrent un résultat principal analogue. Naturellement, on eut égard à l'influence qu'une accumulation d'acide carbonique pouvait avoir.

Des expériences réalisées de la même façon que celles que je viens de décrire, mais dans lesquelles j'avais substitué de l'eau distillée au moût, firent également voir que la formation des spores dépend à un haut degré de l'aération.

J'ai également pu observer dans ces expériences que les individus ne se comportent pas identiquement: quelques-uns peuvent se contenter de la très minime quantité d'air qu'au début de l'expérience ils trouvent dans l'épaisse couche d'eau; d'autres ne s'en contentent point. Pour que la grande majorité de cellules puissent suivre dans cette voie, il faut une forte provision d'air; dans les couches épaisses cela n'a lieu qu'imparfaitement, et seulement après un temps plus ou moins long. Si dans une culture en eau on place des cellules vieilles et usées, il peut se produire le cas que seulement les cellules où l'air a largement accès dès le début de l'expérience produisent des spores, et qu'aucune des cellules renfermées dans les épaisses couches d'eau n'y arrive. Un pareil résultat eut lieu dans une expérience sur des cellules des *Sacch. Pastorianus* II et *Sacch. ellipsoideus* I provenant d'une végétation engendrée dans l'espace de 20 jours dans de l'eau distillée à 25° C. Si cette végétation avait passé encore plus longtemps dans les circonstances indiquées, le moment serait naturellement venu où le manque de nourriture aurait produit l'effet de rendre impossible toute sporulation, quand même les cellules seraient placées dans les conditions les plus favorables sous ce rapport. De ce point jusqu'à la limite de la vitalité il peut y avoir un grand chemin à parcourir. En somme, c'est dans les expériences sur les cellules âgées que la nécessité de l'air saute le plus aux yeux.

A ce groupe d'expériences se rattache aussi celle que je vais décrire et qui se rapporte aux *Sacch. cerevisiae* I et *Sacch. Pastorianus* I. Après avoir lavé, pendant 1 heure $\frac{1}{2}$ à 2° C., des végétations jeunes prises dans des cultures en moût, je les ai semées dans des flacons Freudenreich contenant de minces couches d'eau (dans chaque flacon 5 gouttes) et desquels l'air avait été chassé. Je plaçai une série de ces flacons sous une cloche avec une solution alcaline de pyrogallole, une autre série en dehors de la cloche, dans l'un et l'autre cas à la température de 25° C. On a raréfié, par aspiration, l'air renfermé dans

la cloche jusqu'à ce que la pression fût de 15 à 16^{mm} de mercure. Au bout de 6 jours, tous les flacons qu'on avait laissés en dehors de la cloche se trouvaient avoir produit des spores en abondance, tandis que dans les végétations renfermées dans la cloche on n'en a pu constater aucune trace. Puis, ces dernières végétations furent également placées en dehors de la cloche, de sorte que l'air y eut accès; la conséquence fut qu'au bout de quelques jours elles donnèrent toutes une assez abondante production de spores. Par conséquent, également pour ce dispositif des expériences, c'était la provision d'air qui provoquait la sporulation.

Comme nous l'avons rappelé plus haut, on a en général supposé que l'oxygène était le plus important des éléments de l'air à l'égard de la production de spores; mais on n'a pas fait d'expériences spéciales pour le prouver. Dans ce qui va suivre, on examinera sous ce rapport et séparément chacun des principaux éléments de l'air atmosphérique: azote, oxygène, acide carbonique.

Pour ces recherches j'ai choisi les deux espèces *Sacch. cerevisiae* I et *Johannisberg* II, types de levure qui ne sont pas seulement de vigoureux producteurs de spores, mais qui présentent en outre des exemples vraiment typiques de levure haute et levure basse, de levure de bière et de levure sauvage. Le résultat acquiert par là une plus grande universalité. Quelques-unes de ces expériences furent faites avec des cellules vieilles, d'autres avec des cellules jeunes, mais toujours prises dans une végétation de culture en moût. Les vieilles végétations provenaient d'une culture à la température ordinaire du laboratoire, soit pendant 7 jours, soit durant 2 mois, les végétations jeunes d'une culture en 24 heures à 25°C. Pour quelques-unes des expériences, on les a prises directement dans la culture en moût dans laquelle elles avaient été engendrées, tandis que pour les autres expériences on les a préalablement lavées rapidement dans de l'eau stérilisée et à environ 1°C. Ce traitement n'a cependant exercé aucune influence sur le résultat principal. La plupart de ces expériences furent faites dans les cultures en eau décrites ci-dessus, partie en couches minces, partie en couches épaisses. Dans tous les cas, l'eau avait été débarrassée immédiatement auparavant de son air, puis rapidement saturée du gaz dont il s'agissait. Après que les cellules de levure y eurent été ajoutées, on a expulsé vivement et complètement l'air qui se trouvait dans le flacon au-dessus du liquide, en même temps qu'on y a introduit le gaz sur lequel l'expérience devait être faite. Les expériences ont été réalisées en partie de façon qu'on ferma complètement les flacons immédiatement après les avoir remplis du gaz en question, en partie de sorte qu'on fit passer sans cesse ce gaz à travers le flacon, soit au

travers du liquide même, soit seulement sur sa surface. Les flacons étaient munis, suivant les cas différents, de tubes etc. appropriés à ces diverses exigences. A côté de ces flacons, on plaça des flacons de contrôle et contenant des cultures traitées de la manière décrite, mais auxquels l'air atmosphérique avait accès. La température était de 25° C.

Au bout de 5 jours, les cultures à l'azote ne montraient encore aucun signe de sporulation, tandis que les cultures de contrôle contenaient au contraire, comme à l'ordinaire, beaucoup de spores. Lorsque les cultures à l'azote furent exposées à l'action de l'air atmosphérique, elles formaient, elles aussi, de nombreuses spores après 5 jours.

Les expériences faites avec l'acide carbonique donnèrent le même résultat principal. Quoique ce gaz soit un principe virulent pour les cellules, elles peuvent pourtant en supporter une quantité assez considérable sans cesser complètement le bourgeonnement et la production de spores.

Enfin, on a aussi, et de la manière ci-dessus décrite, entrepris une série d'expériences avec l'oxygène; pour comparer, on avait en ce cas placé des cultures tout-à-fait analogues, mais avec exclusion de l'oxygène. On en vint à constater que la sporulation avait lieu constamment dans les cultures additionnées d'oxygène, et jamais dans celles desquelles l'oxygène était complètement éliminé.

Quant à l'élimination de l'oxygène, elle n'a pas seulement été pratiquée de la manière ordinaire, soit à l'aide d'une solution alcaline de pyrogallole, mais encore au moyen d'une solution chlorhydrique de l'acétate de protoxyde de chrome. C'est mon collègue, M. le Dr Sørensen, qui a eu l'amabilité de m'indiquer ce dernier procédé excellent.

Comme on devait s'y attendre, les expériences dont on vient de parler ont démontré que l'oxygène est un facteur absolument nécessaire pour la production de spores.

Le bourgeonnement peut aussi avoir lieu quand même l'oxygène viendrait à manquer; il en a été ainsi dans les expériences ci-dessus décrites et faites dans l'azote libre d'oxygène. En cela, cette fonction se distingue donc nettement de la sporulation. Il suffit cependant d'une petite quantité d'oxygène pour que des cellules vigoureuses puissent former des spores. On sera par conséquent déçu si l'on ne prend pas soin que les gaz sur lesquels on expérimente soient complètement débarrassés d'air atmosphérique et d'oxygène. Les communications publiées en ces derniers temps et d'après lesquelles la sporulation devait dans certains microorganismes pouvoir se produire vigoureusement dans l'azote pur, tiennent sans doute à une erreur de ce genre.

Dans son mémoire „Ueber die Fetthildung bei den niederen Pilzen“

(Sitzungsber. d. K. Bayr. Acad. d. Wissensch., 1879), Nägeli émet l'idée que la sporulation ne s'opère que „quand les cellules se trouvent répandues, dans un état à demi desséché, sur un substratum“. Toutefois, il ne paraît pas que cette assertion soit basée sur des recherches spéciales. Elle a passé dans les „Vorlesungen über Pflanzenphysiologie“ de Sachs, et de cet ouvrage dans plusieurs autres écrits; on l'a également avancée parfois dans les derniers temps. Nous allons examiner de plus près cet état de choses.

Si dans les expériences ci-dessus avec la bière dans les chambres Ranvier nous ne prenons pas soin d'exclure toute évaporation, il ne s'opère aucune sporulation. Les cellules de la culture en eau sont, il est vrai, un peu moins susceptibles à cet égard, mais le résultat principal reste cependant le même. Je vais décrire ici une expérience que j'ai faite dans le temps et ayant en vue cette question: Je préparai de la manière ordinaire une série de cultures sur blocs de plâtre, et aussitôt que ceux-ci eurent absorbé de l'eau au point de s'en remplir complètement, je les tirai des coupes renfermant l'eau et les transportai chacun dans sa coupe vide. Celle-ci ne vint à contenir d'autre liquide que celui qu'apportaient les blocs eux-mêmes. Quelques-unes de ces coupes furent fermées avec leurs couvercles en verre, les autres au contraire avec du papier-filtre. Pour pouvoir comparer, je mis de côté quelques cultures ordinaires sur blocs de plâtre; ces blocs étaient constamment entourés d'eau, et l'air était saturé d'humidité. La température à laquelle cette expérience fut réalisée était de 25°C. Le résultat fut que la formation des spores s'opérait plus vite et plus abondamment dans les cultures ordinaires, à savoir après 24 heures de repos; venaient ensuite les cultures sur les blocs fermés avec un couvercle en verre dans les coupes vides, à savoir après 29 heures de repos; en troisième ligne venaient les cultures couvertes seulement de papier-filtre: sur ces blocs la production des spores n'avait lieu qu'au bout de 44 heures, et encore sur quelques-uns d'eux seulement. Toutefois, même ici la levure s'était maintenue humide. Toutes ces expériences montrent, en un mot, que l'évaporation empêche la formation des spores, bien que plusieurs des cellules puissent aussi développer ces corps de reproduction quand elles se trouvent sur un milieu exposé à quelque évaporation.

Dans la nature c'est surtout dans les couches supérieures du sol que se développent les spores, à condition bien entendu que ces couches aient un degré convenable d'humidité; les spores se forment également dans le jus provenant de fruits, tels que les raisins, prunes, groseilles à maquereau, cerises, etc. Quant aux conditions favorables à la sporulation et que nous offrons aux cellules dans nos expériences de labora-

toire, les rencontreront-elles bien rarement dans la nature, où bientôt après leur entrée dans la voie de la sporulation elles seront très souvent exposées à ce qu'une évaporation survienne autour d'elles. Les expériences ci-dessus décrites nous montrent que quelques-unes d'entre elles, même dans ces conditions peu favorables, sont à même de parcourir d'un bout à l'autre la marche complète du développement. En conséquence, la sporulation a lieu plus fréquemment dans la nature qu'on ne devrait s'y attendre.

L'agent qui se prête le mieux à l'analyse, c'est la température; aussi ai-je insisté tout particulièrement sur les analyses faites sous ce rapport. Au chapitre 1^{er}, j'ai renvoyé brièvement aux courbes de température pour la marche évolutionnaire des spores que j'avais déterminées en 1883 dans six espèces. Plus tard, j'ai déterminé les températures limites de ladite fonction dans le *Johannisberg II*. Nielsen et Klöcker ont effectué des analyses analogues des *Sacch. anomalus*, *Sacch. membranæfaciens*, *Sacch. Ludwigii* et *Sacch. Marxianus* (Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg III, 1894, Livr. 3, et IV, 1895, Livr. 1). Les températures limites pour la sporulation de ces espèces sont indiquées ci-après pour la comparaison des températures limites du bourgeonnement (voir p. 76).

<i>Sacch. cerevisiæ</i> I.....	A	36—37°	peu de cellules sporif., à	37½° C. point.
		11—12°	—	9°
<i>S. Pastorianus</i> I.....		29½—30½°	—	31½°
		3—4°	—	½°
<i>S. Pastorianus</i> II.....		27—28°	—	29°
		3—4°	—	½°
<i>S. Pastorianus</i> III.....		27—28°	—	29°
		8½°	—	4°
<i>S. ellipsoideus</i> I.....		30½—31½°	—	32½°
		7½°	—	4°
<i>S. ellipsoideus</i> II.....		33—34°	—	35°
		8°	—	4°
<i>S. Marxianus</i>		32°	—	34°
		8°	—	4°
<i>S. anomalus</i>		32—32½°	—	34°
		6—7½°	—	2½—3°
<i>S. membranæfaciens</i> ...		33—33½°	—	35°
		6—7½°	—	2½—3°
<i>S. Ludwigii</i>		32—32½°	—	34°
		6—7½°	—	2½—3°
<i>Johannisberg II</i>		33—34°	—	34½°
		3°	—	2°

en sporanges. Et la spore renflée, qui par la germination n'est pas encore entrée dans la phase de cellule de levure, peut aussi, comme nous l'avons appris dans le traité précédent, devenir sporange, donc sans qu'il se forme une seule génération végétative.

Malgré la facilité avec laquelle les cellules passent d'une forme à une autre, néanmoins ces fonctions, bourgeonnement et sporulation, sont deux choses à part et peuvent se séparer complètement. J'ai démontré dans mon mémoire sur la variation (la présente série 1900) que nous pouvons enlever à la cellule la dernière de ces fonctions sans pour cela empiéter sur la première. De plus, il est fort probable que nous arriverons aussi un jour à éliminer le bourgeonnement, de sorte que la sporulation resterait seule. Les recherches exposées dans mon mémoire précédent nous ouvrent la perspective d'y parvenir.

Nos recherches nous ayant montré non seulement que chaque cellule végétative est apte à développer des spores directement, mais encore que la spore elle-même peut devenir sporange, il est établi par là qu'il n'est pas nécessaire que la formation de spores soit précédée d'un système végétatif. Conséquemment, les *Saccharomycètes* se distinguent sous ce rapport non seulement des plantes supérieures, mais probablement encore de la plupart des Champignons.

Toutefois, la marche ordinaire de l'évolution consiste en ce que, avant le commencement de la sporulation, il se forme par bourgeonnement de nombreuses générations de cellules végétatives. Tant que les conditions extérieures le permettent, les cellules continuent à se multiplier par le bourgeonnement. Comme nous l'avons mentionné au chapitre 1^{er}, elles peuvent persister dans cette voie pendant de longues années et former d'interminables générations végétatives.

Il est bon de remarquer que parmi les levures de l'industrie ce sont précisément les plus anciennes, à savoir les levures de bière à fermentation haute, qui se signalent par la plus active production de spores. On eût pu s'attendre ici à ce que le bourgeonnement poursuivi pendant si longtemps eût fini par supplanter la sporulation, et c'est aussi là ce que dans son temps plusieurs investigateurs considéraient comme chose admise. C'est pourquoi pour mes analyses dans ce domaine je choisis particulièrement la levure anglaise de fermentation haute que j'ai appelée *Saccharomyces cerevisiæ* L. Cette dernière a probablement vécu durant des siècles dans les brasseries d'Angleterre, où elle ne s'est multipliée que par bourgeonnement; elle n'en est pas moins encore aujourd'hui au nombre de celles qui possèdent le plus grand pouvoir de produire des spores. Plusieurs autres levures de l'industrie et levures sauvages, qui ont été cultivées pendant plus de vingt années au laboratoire de Carlsberg dans des conditions telles qu'elles ne pou-

vaient se multiplier que par bourgeonnement, ont également pleinement conservé leur faculté de produire des spores. Le résultat principal, c'est que l'emploi et le développement exclusifs de l'une de ces fonctions n'ont pas supprimé l'autre. Et pourtant il s'agit ici d'un nombre de générations dépassant de beaucoup les plus grands chiffres avec lesquels nous avons jamais à compter dans les végétaux supérieurs.

Quand, par une raison ou une autre, le bourgeonnement est arrêté, les cellules cherchent à continuer la vie par d'autres voies; elles peuvent le faire soit en formant des spores dans leur intérieur, soit en adaptant leur plasma et leurs parois de manière à pouvoir résister aux mauvaises influences extérieures que les conditions nouvelles apportaient avec elles. Parfois on ne peut découvrir aucune différence entre ces cellules et les cellules végétatives ordinaires, parfois on peut observer que leur paroi s'est épaissie et est venue à former plusieurs couches; dans ce dernier cas nous obtenons le type que chez les Champignons on appelle généralement chlamydospores. Elles peuvent revêtir toutes ces différentes formes par exemple pendant l'hivernage dans le sol qui est la règle générale pour les levures sauvages.

De là, nous passons à la considération du dispositif des différentes méthodes de culture de spores. La culture la plus fréquemment employée se fait dans de minces couches d'eau se trouvant soit à la surface des blocs de plâtre, soit au fond des matras ou dans les chambres humides, soit encore sur des couches de gélatine pure. Les cellules jeunes et bien nourries placées dans ces couches d'eau se mettent aussitôt à bourgeonner. Les matières nourricières renfermées dans leur intérieur sont par là consommées jusqu'à un certain degré, et il se développe à la fin des cellules d'une composition chimique telle que dans les conditions présentes elles ne sont plus capables de produire des bourgeons; elles commencent alors à développer des spores dans leur intérieur. On peut dire au sujet de cet état de choses que les matières nutritives propres au bourgeonnement ne sont plus présentes, tandis que celles appropriées à la sporulation s'y trouvent. Toutefois, nous ne devons pas nous figurer la chose comme une simple soustraction; il ne faut point la concevoir comme si la phase du bourgeonnement représentait quelque chose de plus et celle de la sporulation quelque chose de moins de la même matière nutritive. Il faut plutôt admettre qu'il s'opère des groupements nouveaux. Cependant la chimie ne nous est d'aucun secours sur ce terrain, et nous, nous ne sommes pas à même de commencer une analyse.

Dans la culture de spores dans les liquides nutritifs mentionnés ci-dessus: moût de bière, bière, moût de raisins, vin, eau de levure, les cellules sont situées autrement qu'elles ne le sont dans les cultures en

en sporanges. Et la spore renflée, qui par la germination n'est pas encore entrée dans la phase de cellule de levure, peut aussi, comme nous l'avons appris dans le traité précédent, devenir sporange, donc sans qu'il se forme une seule génération végétative.

Malgré la facilité avec laquelle les cellules passent d'une forme à une autre, néanmoins ces fonctions, bourgeonnement et sporulation, sont deux choses à part et peuvent se séparer complètement. J'ai démontré dans mon mémoire sur la variation (la présente série 1900) que nous pouvons enlever à la cellule la dernière de ces fonctions sans pour cela empiéter sur la première. De plus, il est fort probable que nous arriverons aussi un jour à éliminer le bourgeonnement, de sorte que la sporulation resterait seule. Les recherches exposées dans mon mémoire précédent nous ouvrent la perspective d'y parvenir.

Nos recherches nous ayant montré non seulement que chaque cellule végétative est apte à développer des spores directement, mais encore que la spore elle-même peut devenir sporange, il est établi par là qu'il n'est pas nécessaire que la formation de spores soit précédée d'un système végétatif. Conséquemment, les Saccharomycètes se distinguent sous ce rapport non seulement des plantes supérieures, mais probablement encore de la plupart des Champignons.

Toutefois, la marche ordinaire de l'évolution consiste en ce que, avant le commencement de la sporulation, il se forme par bourgeonnement de nombreuses générations de cellules végétatives. Tant que les conditions extérieures le permettent, les cellules continuent à se multiplier par le bourgeonnement. Comme nous l'avons mentionné au chapitre 1^{er}, elles peuvent persister dans cette voie pendant de longues années et former d'interminables générations végétatives.

Il est bon de remarquer que parmi les levures de l'industrie ce sont précisément les plus anciennes, à savoir les levures de bière à fermentation haute, qui se signalent par la plus active production de spores. On eût pu s'attendre ici à ce que le bourgeonnement poursuivi pendant si longtemps eût fini par supplanter la sporulation, et c'est aussi là ce que dans son temps plusieurs investigateurs considéraient comme chose admise. C'est pourquoi pour mes analyses dans ce domaine je choisis particulièrement la levure anglaise de fermentation haute que j'ai appelée *Saccharomyces cerevisiæ* I. Cette dernière a probablement vécu durant des siècles dans les brasseries d'Angleterre, où elle ne s'est multipliée que par bourgeonnement; elle n'en est pas moins encore aujourd'hui au nombre de celles qui possèdent le plus grand pouvoir de produire des spores. Plusieurs autres levures de l'industrie et levures sauvages, qui ont été cultivées pendant plus de vingt années au laboratoire de Carlsberg dans des conditions telles qu'elles ne pou-

vaient se multiplier que par bourgeonnement, ont également pleinement conservé leur faculté de produire des spores. Le résultat principal, c'est que l'emploi et le développement exclusifs de l'une de ces fonctions n'ont pas supprimé l'autre. Et pourtant il s'agit ici d'un nombre de générations dépassant de beaucoup les plus grands chiffres avec lesquels nous avons jamais à compter dans les végétaux supérieurs.

Quand, par une raison ou une autre, le bourgeonnement est arrêté, les cellules cherchent à continuer la vie par d'autres voies; elles peuvent le faire soit en formant des spores dans leur intérieur, soit en adaptant leur plasma et leurs parois de manière à pouvoir résister aux mauvaises influences extérieures que les conditions nouvelles apportaient avec elles. Parfois on ne peut découvrir aucune différence entre ces cellules et les cellules végétatives ordinaires, parfois on peut observer que leur paroi s'est épaissie et est venue à former plusieurs couches; dans ce dernier cas nous obtenons le type que chez les Champignons on appelle généralement chlamydospores. Elles peuvent revêtir toutes ces différentes formes par exemple pendant l'hivernage dans le sol qui est la règle générale pour les levures sauvages.

De là, nous passons à la considération du dispositif des différentes méthodes de culture de spores. La culture la plus fréquemment employée se fait dans de minces couches d'eau se trouvant soit à la surface des blocs de plâtre, soit au fond des matras ou dans les chambres humides, soit encore sur des couches de gélatine pure. Les cellules jeunes et bien nourries placées dans ces couches d'eau se mettent aussitôt à bourgeonner. Les matières nourricières renfermées dans leur intérieur sont par là consommées jusqu'à un certain degré, et il se développe à la fin des cellules d'une composition chimique telle que dans les conditions présentes elles ne sont plus capables de produire des bourgeons; elles commencent alors à développer des spores dans leur intérieur. On peut dire au sujet de cet état de choses que les matières nutritives propres au bourgeonnement ne sont plus présentes, tandis que celles appropriées à la sporulation s'y trouvent. Toutefois, nous ne devons pas nous figurer la chose comme une simple soustraction; il ne faut point la concevoir comme si la phase du bourgeonnement représentait quelque chose de plus et celle de la sporulation quelque chose de moins de la même matière nutritive. Il faut plutôt admettre qu'il s'opère des groupements nouveaux. Cependant la chimie ne nous est d'aucun secours sur ce terrain, et nous, nous ne sommes pas à même de commencer une analyse.

Dans la culture de spores dans les liquides nutritifs mentionnés ci-dessus: moût de bière, bière, moût de raisins, vin, eau de levure, les cellules sont situées autrement qu'elles ne le sont dans les cultures en

eau; c'est pourquoi nous pouvons admettre que, arrivées au point où le bourgeonnement s'arrête et où la sporulation commence, elles se comportent autrement qu'elles ne le faisaient lorsqu'elles en étaient au point correspondant dans les cultures en eau. Cependant, même dans ces cas, la cellule arrive à un moment où, faute de nourriture dans son entourage ainsi que dans elle-même, le bourgeonnement ne peut plus avoir lieu. Une influence des matières dues à l'action chimique de la cellule sur le milieu s'y trouve peut-être aussi sous ces conditions.

Nous avons vu au chapitre premier que des cellules qui ont atteint un certain âge et qui se trouvent dans un certain état d'alimentation, peuvent, sans bourgeonnement préalable, entrer dans la voie de la sporulation, quand on les place dans les chambres humides renfermant de l'eau distillée. De même que dans les cas précédents, on peut affirmer dans ce cas également que c'est le manque d'aliments dans la cellule même et dans son entourage qui empêche le bourgeonnement de se produire.

Dans ce qui précède, mes expériences faites sur la gélatine nutritive n'ont été mentionnées que brièvement, et puisque Klebs donne une explication qui ne concorde pas avec le résultat auquel je suis arrivé, j'ai par conséquent un double motif pour en faire une mention un peu plus détaillée ici. J'ai fait mes expériences nouvelles sur les deux espèces *Sacch. cerevisiæ* I et *Johannisberg* II semées sur des couches épaisses, soit de gélatine mélangée de moût de bière, soit de gélatine à l'eau de levure. La semence fut en plusieurs cas inoculée sur la gélatine sous forme de raies que j'y traçai, dans d'autres cas à l'état de gouttes renfermant un petit nombre de cellules de l'espèce dont il s'agissait; les cultures étaient placées sous des cloches, et l'on pourvoyait à ce que l'air fût suffisamment renouvelé et maintenu humide. Il se posa alors la question de savoir si la sporulation aurait lieu aussi sur les bords des végétations, où les cellules étaient en contact immédiat avec le milieu nourricier, ou si elle serait bornée à la partie centrale des végétations, c'est-à-dire aux cellules qui ne communiquaient plus directement avec la source d'alimentation. En examinant les végétations de *Sacch. cerevisiæ* I sur la gélatine au moût après 3 semaines de séjour à 25°C., je trouvai, sur le bord extérieur, quelques rares cellules ayant formé des spores, et après 2 mois de repos le nombre des cellules sporifères du bord paraissait égal à celui des cellules centrales. Dans de vieilles végétations de *Johannisberg* II sur la gélatine au moût, je fis des constatations analogues. Que la gélatine avoisinant le bord continuât à être un bon milieu nourricier, c'est ce qu'on pouvait montrer en y traçant, à l'aide d'un fil de platine, des raies du bord de la végétation; car ces raies prirent une croissance rapide. A l'instar de

la colonie mère, elles engendraient des cellules sporifères tant à leurs bords qu'à leur milieu. En somme, la végétation sur la gélatine continue à s'étendre, pourvu que l'on ait soin de pourvoir à ce que la température soit convenable, et à ce que l'air, suffisamment renouvelé, soit saturé d'humidité. De même que dans les cultures en eau, on pouvait observer ici encore que quelques-unes des cellules se propageaient par bourgeonnement, alors que d'autres, situées tout près des premières, développaient des endospores.

Sur la gélatine mélangée d'eau de levure, je fis également des observations analogues dans ses végétations de Johannisberg II, après que les cultures eurent séjourné dans plusieurs cas pendant 3 semaines à la température du local, dans d'autres durant 27 jours à 25°C. Inutile de rappeler que ces essais sont, de même que d'autres du même genre, soumis à des oscillations notables; il ne s'agit pour nous que du résultat principal.

Klöcker a récemment ici au laboratoire de Carlsberg fait des observations analogues dans ses essais de culture avec le *Saccharomyces* découvert par lui chez les abeilles (On trouve une description de cette levure dans les Comptes rendus du Laboratoire de Carlsberg, vol. V, 1900, page 62). En examinant ses végétations sur de la gélatine au moût après 26 jours de repos à la température du laboratoire, il constata, en effet, que la zone marginale contenait, en plusieurs endroits, même de très nombreuses cellules sporifères.

Même pour la sporulation qui se produit sur la gélatine nutritive, Klebs donne comme explication l'absence d'aliments. Il part, en effet, de l'opinion qu'elle n'a lieu que chez les cellules qui se trouvent dans les couches supérieures de la colonie de levure et qui ne sont pas en contact avec la substance nourricière. Selon Klebs, la formation des spores ne se produirait donc qu'au milieu des colonies, et non pas dans leur zone marginale. Or, il résulte clairement des recherches que je viens d'exposer que cette manière de voir n'est pas juste: Elles nous ont fait voir que même des cellules bien nourries et qui ont un large accès à la nourriture sont néanmoins aptes à développer des spores. Si les cellules des colonies de la gélatine nutritive s'écartent de la voie du bourgeonnement, il faut en chercher la cause dans une action exercée par des produits des cellules. L'un de ces produits, savoir l'alcool, sera mentionné plus loin.

Aux essais de culture de spores sur la gélatine nutritive viennent se rattacher ceux que j'ai entrepris dans des solutions de sulfate de chaux. On se rappellera que les jeunes cellules vigoureuses et bien nourries qu'on y avait semées développaient directement des endospores sans bourgeonnement préalable. Ces cellules sporo-

gènes sont aussi bien nourries que possible, et elles continuent à l'être; ainsi, ici non plus, il n'est nullement question d'un manque d'aliment dans les cellules elles-mêmes. Le fait est que c'est le principe virulent qu'on a mis dans l'eau qui a empêché le bourgeonnement. Quand la spore se développe directement en sporange, c'est également une cellule bien nourrie qui, sous l'action du sulfate de chaux, est mise à même de passer sur le bourgeonnement et d'entrer directement dans la voie de la sporulation. Dans tous ces cas c'est le sulfate de chaux qui empêche la cellule d'arriver par voie de bourgeonnement au point où le manque de nourriture commence.

L'alcool éthylique produit un effet analogue. Dans les solutions faibles de cette substance le bourgeonnement a encore lieu d'une manière assez active. Par contre, une solution à 10⁰/o agit en somme de la même manière que la solution saturée de sulfate de chaux. Ces expériences furent faites sur de jeunes cellules de *Johannisberg II*. Après 3 jours de séjour à 25°C. dans la solution d'alcool susnommée, bon nombre d'elles avaient développé des spores sans bourgeonnement préalable.

L'absence de nourriture est un élément des plus importants quand il s'agit d'arrêter le bourgeonnement, et par là elle peut dans certaines conditions de culture concourir également à la production des spores. Il va sans dire que ce n'est pas tout genre d'absence d'aliments dans la cellule, et que ce n'est pas tout genre d'absence de matières nutritives dans son entourage qui soit capable de produire cet effet; mais même là où nous avons devant nous l'absence propre de nourriture, il y a toute une gradation et un grand champ libre. En un mot, le manque d'aliments n'est qu'un des différents facteurs qui agissent dans ce sens, et à côté il y en a d'autres de même valeur. Un autre résultat important que nos recherches ont apporté à ce sujet, c'est qu'on a en son pouvoir de disposer les expériences de telle façon que des cellules qui sont abondamment pourvues de nourriture, tant dans leur intérieur qu'autour d'elles, soient néanmoins aptes à développer des spores d'une manière vigoureuse. Ceci a échappé à l'attention de Klebs, qui a attribué à l'une des parties de notre problème une importance qui ne lui revient pas.

Il va de soi que la cessation du bourgeonnement n'entraîne pas toujours la production de spores. Cette production exige, au contraire, tout un ensemble d'autres conditions; nous pouvons qualifier celles-ci de conditions directes. Les voici: un certain état favorable d'alimentation, pour lequel nous manquons toutefois une expression chimique définie, provision d'eau, affluence abondante d'air atmosphérique ou d'oxygène humides, et une température généralement assez élevée. Ces

conditions sont communes à tous les *Saccharomyces*, mais subissent pourtant des variations selon les espèces. Ceci apparaît surtout d'une manière frappante dans les tableaux relatifs à l'influence de la température sur le bourgeonnement et la formation de spores (pages 76 et 83). Mes analyses nouvelles ont, comme on le voit, apporté une confirmation complète de la doctrine avancée par moi auparavant et suivant laquelle la formation des spores a un maximum de température inférieur à celui du bourgeonnement, et elles ont en outre montré que le minimum de température de la sporulation est supérieur à celui du bourgeonnement. Maintenant que les analyses ont été effectuées sur un si grand nombre d'espèces très différentes entre elles, ce résultat peut être considéré comme définitivement établi et comme s'appliquant à tous les *Saccharomycètes*.

Une différence bien prononcée apparaît de même dans les rapports des deux fonctions avec l'oxygène, en ce que le bourgeonnement a lieu même en l'absence d'oxygène libre, tandis que ce n'est pas le cas pour la sporulation. Pour cette dernière fonction, la présence d'oxygène libre est une condition absolument nécessaire.

Nous avons vu que les cellules vieilles et celles qui souffrent de manque de nourriture, par exemple par suite d'un fort lavage, exigent à cet égard particulièrement beaucoup d'oxygène. Les cellules qui se trouvaient dans des liquides qui ne leur fournissaient pas la nourriture dont elles avaient besoin pour pouvoir continuer à bourgeonner, ne développaient des spores que lorsqu'on leur fit affluer de l'air ou de l'oxygène en abondance; autrement, il n'y avait point d'apparence de sporulation. C'est l'oxygène, et non pas le manque de nourriture, qui provoquait le développement des spores. La grande importance qu'a l'oxygène pour la formation des spores est manifeste surtout dans les expériences pratiquées dans les liquides.

Nous voilà ainsi arrivés à la fin de ces recherches sur les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation et sur les conditions auxquelles sont soumises ces deux fonctions de reproduction. Quant aux processus qui ont lieu dans le plasma lui-même lorsque la cellule quitte la voie du bourgeonnement pour entrer dans celle de la production de spores, nous n'en savons encore rien. L'analyse des unités du plasma est un des grands problèmes qui appartiennent à l'avenir. Il est fort probable que la cellule de *Saccharomyces* est l'un des objets se prêtant le mieux aux recherches à faire dans ce sens; mais, en ce qui concerne cette question, tout est encore dans l'obscurité.

Nous sommes arrivés à connaître des procédés qui nous permettent d'arrêter le bourgeonnement de telle façon qu'une sporulation puisse suivre, et nous sommes peu à peu parvenus à voir tellement clair dans

tout ce qui concerne les conditions dans lesquelles ces deux fonctions se réalisent que nous sommes à même de détacher à notre gré et avec sûreté l'une de l'autre et de provoquer celle que nous désirons. La cellule de *Saccharomyces* se prête éminemment à l'élucidation des questions telles que celles que nous avons traitées dans cette section et qui ont de l'importance pour la biologie générale; aussi, même avec les méthodes dont nous disposons actuellement, ce terrain d'investigations reste-t-il un des plus féconds.

2. Levures alcooliques aux cellules ressemblant aux *Saccharomyces*.

Sous cette désignation on peut comprendre une grande série d'espèces très diverses. Plusieurs d'entre elles ont fait l'objet de recherches exposées dans mes mémoires précédents; j'en référerai particulièrement à celui intitulé „Action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre“ et inséré dans l'année 1888 de la présente série.

La *Monilia candida* occupe ici une place à part; c'est une espèce qui dans les dernières années a grandement préoccupé aussi bien des physiologistes que des chimistes. On en trouve, dans le mémoire que je viens de citer, une description accompagnée d'illustrations, dont l'une est reproduite à la page suivante.

Cette figure montre qu'il se trouve chez cette espèce un mycélium type (c). En fait d'organes de reproduction, elle ne développe pas seulement des conidies de cellule de levure (a, b, e), mais encore des oïdies (d). Quand on sème les cellules de levure dans du moût de bière à la température ordinaire du local ou à 25° C., elles se multiplient pendant les premiers temps exclusivement par bourgeonnement, et ce n'est que plus tard qu'il se forme un mycélium. Si l'alimentation continue à être abondante, ce mycélium peut développer des conidies de cellules de levure ou bien se diviser en articles, à l'exemple de ce qui a lieu chez le genre dit *Oïdium*. Toutefois, sous ce dernier rapport, il n'est question que d'une similitude extérieure. Les oïdies de la *Monilia candida* germent par voie de bourgeonnement, ceux des espèces types du genre *Oïdium*, par exemple de l'*Oïdium lactis*, par contre par un tube germinatif (Voir mon mémoire sur l'*Oïdium lactis* dans ces Comptes-rendus 1879). Les remarques que je viens de faire relativement aux différences de nature morphologique, s'appliquent également à plusieurs autres cas, où ce ne sont que des analogies extérieures qui font qu'on parle d'oïdies; tel est aussi le cas en bactériologie. La morphologie comparative a ici un problème à résoudre.

La *Monilia candida* est du nombre des levures qui recouvrent rapidement d'un voile la surface du liquide nutritif. Je fis la culture

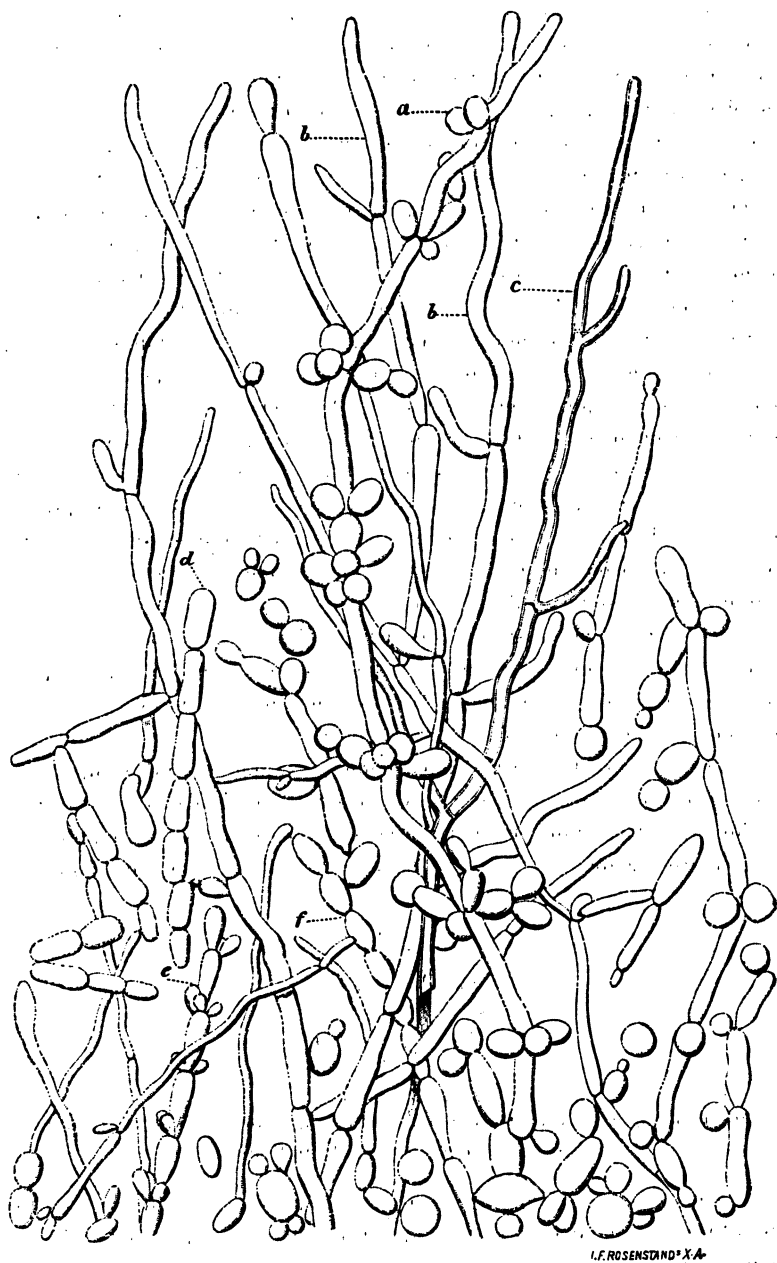


Fig. 2. *Monilia candida*.

Grossissement linéaire de 1000. fois.

dans des flacons Frenckenreich à moitié remplis de moût de bière; le tube du capuchon n'avait pas de coton, mais était muni d'un d'autre tube courbé. Dans ces circonstances les températures limites pour la *Monilia candida* se sont trouvées être de 42—43°C. et de 6—4°C. Cette espèce est donc du nombre de celles qui se distinguent par une température maxima très élevée. Toutefois, elle n'est pas capable de développer un voile près des températures limites, mais se borne alors à continuer sa croissance au-dessous de la surface du liquide nutritif. Il en est de même, nous l'avons vu, du genre de *Saccharomyces* et probablement des levures alcooliques en général. La formation de mycélium est assez prononcée aux températures basses, tandis que dans le voisinage de la température maxima c'est le développement de cellules de levure qui prend le dessus. Les cellules devenues libres ne font pas seulement fonction de conidies, mais servent également à la croissance végétative, et, inversement, toute cellule de la végétation est en état de servir à la propagation; d'organes de reproduction proprement dits, il ne s'en trouve point. Cette nature double est, en somme, propre à la formation de cellules de levure, quels que soient les champignons chez lesquels elle se produise.

Tant chez cette espèce que dans celles dont je vais traiter plus loin, le développement se fait avec une extrême lenteur aux températures basses; conséquemment, l'analyse de chaque culture a dû embrasser plus de 3—4 mois.

Les espèces de *Torula* appartiennent également au groupe dont nous nous occupons ici. Les deux suivantes ont également été décrites et illustrées dans mon mémoire précité. La température maxima de celle figurée ci-après (Fig. 3) est de 36—37°C., sa température minima de 6—4°C.



Fig. 3. *Torula*.

Levure de dépôt prise après 24 heures de culture en moût de bière à 25°C. environ.
Grossissement linéaire de 1000 fois.

Dans l'espèce représentée dans la fig. 4, ces limites sont de 38—39°C. et d'environ 1/2°C. Le dispositif des expériences était le même que ci-dessus mentionné.

De même que dans les *Saccharomycètes*, nous rencontrons donc également dans ce groupe de champignons des espèces ayant des températures limites nettement différentes pour le bourgeonnement.

Aussi aux températures limites, la formation seule de cellules de levure a apparu dans les *Torula* examinées. Ces dernières n'ont pas changé pendant la longue série d'années au courant de laquelle je les

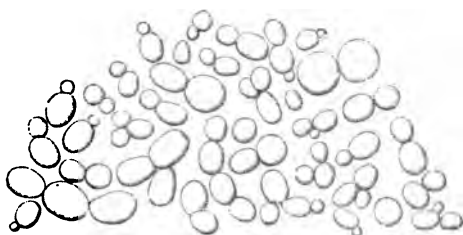


Fig. 4. *Torula*.

Levure de dépôt prise après 24 heures de culture en moût de bière à environ 25°C .

Grossissement linéaire de 1000 fois.

ai examinées. On admet généralement que les *Torula* ne constituent que de simples phases évolutives de champignons supérieurs; s'il en est ainsi, il faut des conditions spéciales de culture, inconnues jusqu'à ce jour, pour les ramener à leur origine.

3. *Oidium lactis*.

Mes recherches antérieures sur cette espèce se trouvent exposées surtout dans les deux mémoires cités au chapitre précédent. Les expériences furent pratiquées suivant la même méthode que pour la *Monilia candida* et les *Torula*. Ce que j'ai dit relativement aux rapports entre le système végétatif et les organes de reproduction de la *Monilia candida*, s'applique également à cette espèce: elle ne présente pas de différence morphologique entre les hyphes produisant des conidies et celles formant un mycélium. Dans cette espèce les deux catégories se montrèrent aussi aux températures limites. De même que dans les espèces précédentes, la formation de voile s'arrête un peu avant que le développement ait atteint sa limite. Dans les susdites cultures en moût, la température maxima est près de $37\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$., la température minima au-dessous de $\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. Par contre, la formation de voile s'arrête à $36\frac{1}{2}$ — $37\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. et à 3°C . environ.

4. *Mucor*.

Les espèces appartenant à ce genre se distinguent par la diversité et la richesse de leurs organes de reproduction: on peut diviser ceux-ci en quatre catégories, à savoir gemmes (chlamydo-spores), cellules de levure, sporanges et zygospores.

gènes sont aussi bien nourries que possible; et elles continuent à l'être; ainsi, ici non plus, il n'est nullement question d'un manque d'aliment dans les cellules elles-mêmes. Le fait est que c'est le principe virulent qu'on a mis dans l'eau qui a empêché le bourgeonnement. Quand la spore se développe directement en sporange, c'est également une cellule bien nourrie qui, sous l'action du sulfate de chaux, est mise à même de passer sur le bourgeonnement et d'entrer directement dans la voie de la sporulation. Dans tous ces cas c'est le sulfate de chaux qui empêche la cellule d'arriver par voie de bourgeonnement au point où le manque de nourriture commence.

L'alcool éthylique produit un effet analogue. Dans les solutions faibles de cette substance le bourgeonnement a encore lieu d'une manière assez active. Par contre, une solution à 10⁰/o agit en somme de la même manière que la solution saturée de sulfate de chaux. Ces expériences furent faites sur de jeunes cellules de *Johannisberg II*. Après 3 jours de séjour à 25°C. dans la solution d'alcool susnommée, bon nombre d'elles avaient développé des spores sans bourgeonnement préalable.

L'absence de nourriture est un élément des plus importants quand il s'agit d'arrêter le bourgeonnement, et par là elle peut dans certaines conditions de culture concourir également à la production des spores. Il va sans dire que ce n'est pas tout genre d'absence d'aliments dans la cellule, et que ce n'est pas tout genre d'absence de matières nutritives dans son entourage qui soit capable de produire cet effet; mais même là où nous avons devant nous l'absence propre de nourriture, il y a toute une gradation et un grand champ libre. En un mot, le manque d'aliments n'est qu'un des différents facteurs qui agissent dans ce sens, et à côté il y en a d'autres de même valeur. Un autre résultat important que nos recherches ont apporté à ce sujet, c'est qu'on a en son pouvoir de disposer les expériences de telle façon que des cellules qui sont abondamment pourvues de nourriture, tant dans leur intérieur qu'autour d'elles, soient néanmoins aptes à développer des spores d'une manière vigoureuse. Ceci a échappé à l'attention de Klebs, qui a attribué à l'une des parties de notre problème une importance qui ne lui revient pas.

Il va de soi que la cessation du bourgeonnement n'entraîne pas toujours la production de spores. Cette production exige, au contraire, tout un ensemble d'autres conditions; nous pouvons qualifier celles-ci de conditions directes. Les voici: un certain état favorable d'alimentation, pour lequel nous manquons toutefois une expression chimique définie, provision d'eau, affluence abondante d'air atmosphérique ou d'oxygène humides, et une température généralement assez élevée. Ces

conditions sont communes à tous les *Saccharomyces*, mais subissent pourtant des variations selon les espèces. Ceci apparaît surtout d'une manière frappante dans les tableaux relatifs à l'influence de la température sur le bourgeonnement et la formation de spores (pages 76 et 83). Mes analyses nouvelles ont, comme on le voit, apporté une confirmation complète de la doctrine avancée par moi auparavant et suivant laquelle la formation des spores a un maximum de température inférieur à celui du bourgeonnement, et elles ont en outre montré que le minimum de température de la sporulation est supérieur à celui du bourgeonnement. Maintenant que les analyses ont été effectuées sur un si grand nombre d'espèces très différentes entre elles, ce résultat peut être considéré comme définitivement établi et comme s'appliquant à tous les *Saccharomycètes*.

Une différence bien prononcée apparaît de même dans les rapports des deux fonctions avec l'oxygène, en ce que le bourgeonnement a lieu même en l'absence d'oxygène libre, tandis que ce n'est pas le cas pour la sporulation. Pour cette dernière fonction, la présence d'oxygène libre est une condition absolument nécessaire.

Nous avons vu que les cellules vieilles et celles qui souffrent de manque de nourriture, par exemple par suite d'un fort lavage, exigent à cet égard particulièrement beaucoup d'oxygène. Les cellules qui se trouvaient dans des liquides qui ne leur fournissaient pas la nourriture dont elles avaient besoin pour pouvoir continuer à bourgeonner, ne développaient des spores que lorsqu'on leur fit affluer de l'air ou de l'oxygène en abondance; autrement, il n'y avait point d'apparence de sporulation. C'est l'oxygène, et non pas le manque de nourriture, qui provoquait le développement des spores. La grande importance qu'a l'oxygène pour la formation des spores est manifeste surtout dans les expériences pratiquées dans les liquides.

Nous voilà ainsi arrivés à la fin de ces recherches sur les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation et sur les conditions auxquelles sont soumises ces deux fonctions de reproduction. Quant aux processus qui ont lieu dans le plasma lui-même lorsque la cellule quitte la voie du bourgeonnement pour entrer dans celle de la production de spores, nous n'en savons encore rien. L'analyse des unités du plasma est un des grands problèmes qui appartiennent à l'avenir. Il est fort probable que la cellule de *Saccharomyces* est l'un des objets se prêtant le mieux aux recherches à faire dans ce sens; mais, en ce qui concerne cette question, tout est encore dans l'obscurité.

Nous sommes arrivés à connaître des procédés qui nous permettent d'arrêter le bourgeonnement de telle façon qu'une sporulation puisse suivre, et nous sommes peu à peu parvenus à voir tellement clair dans

gènes sont aussi bien nourries que possible, et elles continuent à l'être; ainsi, ici non plus, il n'est nullement question d'un manque d'aliment dans les cellules elles-mêmes. Le fait est que c'est le principe virulent qu'on a mis dans l'eau qui a empêché le bourgeonnement. Quand la spore se développe directement en sporange, c'est également une cellule bien nourrie qui, sous l'action du sulfate de chaux, est mise à même de passer sur le bourgeonnement et d'entrer directement dans la voie de la sporulation. Dans tous ces cas c'est le sulfate de chaux qui empêche la cellule d'arriver par voie de bourgeonnement au point où le manque de nourriture commence.

L'alcool éthylique produit un effet analogue. Dans les solutions faibles de cette substance le bourgeonnement a encore lieu d'une manière assez active. Par contre, une solution à 10% agit en somme de la même manière que la solution saturée de sulfate de chaux. Ces expériences furent faites sur de jeunes cellules de *Johannisberg II*. Après 3 jours de séjour à 25°C. dans la solution d'alcool susnommée, bon nombre d'elles avaient développé des spores sans bourgeonnement préalable.

L'absence de nourriture est un élément des plus importants quand il s'agit d'arrêter le bourgeonnement, et par là elle peut dans certaines conditions de culture concourir également à la production des spores. Il va sans dire que ce n'est pas tout genre d'absence d'aliments dans la cellule, et que ce n'est pas tout genre d'absence de matières nutritives dans son entourage qui soit capable de produire cet effet; mais même là où nous avons devant nous l'absence propre de nourriture, il y a toute une gradation et un grand champ libre. En un mot, le manque d'aliments n'est qu'un des différents facteurs qui agissent dans ce sens, et à côté il y en a d'autres de même valeur. Un autre résultat important que nos recherches ont apporté à ce sujet, c'est qu'on a en son pouvoir de disposer les expériences de telle façon que des cellules qui sont abondamment pourvues de nourriture, tant dans leur intérieur qu'autour d'elles, soient néanmoins aptes à développer des spores d'une manière vigoureuse. Ceci a échappé à l'attention de Klebs, qui a attribué à l'une des parties de notre problème une importance qui ne lui revient pas.

Il va de soi que la cessation du bourgeonnement n'entraîne pas toujours la production de spores. Cette production exige, au contraire, tout un ensemble d'autres conditions; nous pouvons qualifier celles-ci de conditions directes. Les voici: un certain état favorable d'alimentation, pour lequel nous manquons toutefois une expression chimique définie, provision d'eau, affluence abondante d'air atmosphérique ou d'oxygène humides, et une température généralement assez élevée. Ces

conditions sont communes à tous les *Saccharomyces*, mais subissent pourtant des variations selon les espèces. Ceci apparaît surtout d'une manière frappante dans les tableaux relatifs à l'influence de la température sur le bourgeonnement et la formation de spores (pages 76 et 83). Mes analyses nouvelles ont, comme on le voit, apporté une confirmation complète de la doctrine avancée par moi auparavant et suivant laquelle la formation des spores a un maximum de température inférieur à celui du bourgeonnement, et elles ont en outre montré que le minimum de température de la sporulation est supérieur à celui du bourgeonnement. Maintenant que les analyses ont été effectuées sur un si grand nombre d'espèces très différentes entre elles, ce résultat peut être considéré comme définitivement établi et comme s'appliquant à tous les *Saccharomycètes*.

Une différence bien prononcée apparaît de même dans les rapports des deux fonctions avec l'oxygène, en ce que le bourgeonnement a lieu même en l'absence d'oxygène libre, tandis que ce n'est pas le cas pour la sporulation. Pour cette dernière fonction, la présence d'oxygène libre est une condition absolument nécessaire.

Nous avons vu que les cellules vieilles et celles qui souffrent de manque de nourriture, par exemple par suite d'un fort lavage, exigent à cet égard particulièrement beaucoup d'oxygène. Les cellules qui se trouvaient dans des liquides qui ne leur fournissaient pas la nourriture dont elles avaient besoin pour pouvoir continuer à bourgeonner, ne développaient des spores que lorsqu'on leur fit affluer de l'air ou de l'oxygène en abondance; autrement, il n'y avait point d'apparence de sporulation. C'est l'oxygène, et non pas le manque de nourriture, qui provoquait le développement des spores. La grande importance qu'a l'oxygène pour la formation des spores est manifeste surtout dans les expériences pratiquées dans les liquides.

Nous voilà ainsi arrivés à la fin de ces recherches sur les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation et sur les conditions auxquelles sont soumises ces deux fonctions de reproduction. Quant aux processus qui ont lieu dans le plasma lui-même lorsque la cellule quitte la voie du bourgeonnement pour entrer dans celle de la production de spores, nous n'en savons encore rien. L'analyse des unités du plasma est un des grands problèmes qui appartiennent à l'avenir. Il est fort probable que la cellule de *Saccharomyces* est l'un des objets se prêtant le mieux aux recherches à faire dans ce sens; mais, en ce qui concerne cette question, tout est encore dans l'obscurité.

Nous sommes arrivés à connaître des procédés qui nous permettent d'arrêter le bourgeonnement de telle façon qu'une sporulation puisse suivre, et nous sommes peu à peu parvenus à voir tellement clair dans

tout ce qui concerne les conditions dans lesquelles ces deux fonctions se réalisent que nous sommes à même de détacher à notre gré et avec sûreté l'une de l'autre et de provoquer celle que nous désirons. La cellule de *Saccharomyces* se prête éminemment à l'élucidation des questions telles que celles que nous avons traitées dans cette section et qui ont de l'importance pour la biologie générale; aussi, même avec les méthodes dont nous disposons actuellement, ce terrain d'investigations reste-t-il un des plus féconds.

2. Levures alcooliques aux cellules ressemblant aux *Saccharomyces*.

Sous cette désignation on peut comprendre une grande série d'espèces très diverses. Plusieurs d'entre elles ont fait l'objet de recherches exposées dans mes mémoires précédents; j'en référerai particulièrement à celui intitulé „Action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre“ et inséré dans l'année 1888 de la présente série.

La *Monilia candida* occupe ici une place à part; c'est une espèce qui dans les dernières années a grandement préoccupé aussi bien des physiologistes que des chimistes. On en trouve, dans le mémoire que je viens de citer, une description accompagnée d'illustrations, dont l'une est reproduite à la page suivante.

Cette figure montre qu'il se trouve chez cette espèce un mycélium type (c). En fait d'organes de reproduction, elle ne développe pas seulement des conidies de cellule de levure (a, b, e), mais encore des oïdies (d). Quand on sème les cellules de levure dans du moût de bière à la température ordinaire du local ou à 25° C., elles se multiplient pendant les premiers temps exclusivement par bourgeonnement, et ce n'est que plus tard qu'il se forme un mycélium. Si l'alimentation continue à être abondante, ce mycélium peut développer des conidies de cellules de levure ou bien se diviser en articles, à l'exemple de ce qui a lieu chez le genre dit *Oïdium*. Toutefois, sous ce dernier rapport, il n'est question que d'une similitude extérieure. Les oïdies de la *Monilia candida* germent par voie de bourgeonnement, ceux des espèces types du genre *Oïdium*, par exemple de l'*Oïdium lactis*, par contre par un tube germinatif (Voir mon mémoire sur l'*Oïdium lactis* dans ces Comptes-rendus 1879). Les remarques que je viens de faire relativement aux différences de nature morphologique, s'appliquent également à plusieurs autres cas, où ce ne sont que des analogies extérieures qui font qu'on parle d'oïdies; tel est aussi le cas en bactériologie. La morphologie comparative a ici un problème à résoudre.

La *Monilia candida* est du nombre des levures qui recouvrent rapidement d'un voile la surface du liquide nutritif. Je fis la culture



Fig. 2. *Monilia candida*.
Grossissement linéaire de 1000 fois.

dans des flacons Freudenreich à moitié remplis de moût de bière; le tube du capuchon n'avait pas de coton, mais était muni d'un d'autre tube courbé. Dans ces circonstances les températures limites pour la *Monilia candida* se sont trouvées être de 42—43°C. et de 6—4°C. Cette espèce est donc du nombre de celles qui se distinguent par une température maxima très élevée. Toutefois, elle n'est pas capable de développer un voile près des températures limites, mais se borne alors à continuer sa croissance au-dessous de la surface du liquide nutritif. Il en est de même, nous l'avons vu, du genre de *Saccharomyces* et probablement des levures alcooliques en général. La formation de mycélium est assez prononcée aux températures basses, tandis que dans le voisinage de la température maxima c'est le développement de cellules de levure qui prend le dessus. Les cellules devenues libres ne font pas seulement fonction de conidies, mais servent également à la croissance végétative, et, inversement, toute cellule de la végétation est en état de servir à la propagation; d'organes de reproduction proprement dits, il ne s'en trouve point. Cette nature double est, en somme, propre à la formation de cellules de levure, quels que soient les champignons chez lesquels elle se produise.

Tant chez cette espèce que dans celles dont je vais traiter plus loin, le développement se fait avec une extrême lenteur aux températures basses; conséquemment, l'analyse de chaque culture a dû embrasser plus de 3—4 mois.

Les espèces de *Torula* appartiennent également au groupe dont nous nous occupons ici. Les deux suivantes ont également été décrites et illustrées dans mon mémoire précité. La température maxima de celle figurée ci-après (Fig. 3) est de 36—37°C., sa température minima de 6—4°C.



Fig. 3. *Torula*.

Levure de dépôt prise après 24 heures de culture en moût de bière à 25°C. environ.
Grossissement linéaire de 1000 fois.

Dans l'espèce représentée dans la fig. 4, ces limites sont de 38—39°C. et d'environ 1/2°C. Le dispositif des expériences était le même que ci-dessus mentionné.

De même que dans les *Saccharomycètes*, nous rencontrons donc également dans ce groupe de champignons des espèces ayant des températures limites nettement différentes pour le bourgeonnement.

Aussi aux températures limites, la formation seule de cellules de levure a apparu dans les *Torula* examinées. Ces dernières n'ont pas changé pendant la longue série d'années au courant de laquelle je les

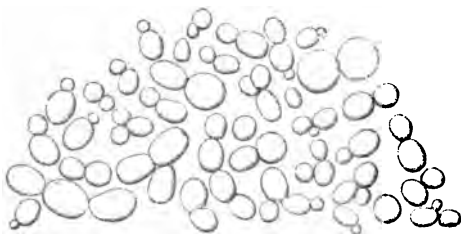


Fig. 4. *Torula*.

Levure de dépôt prise après 24 heures de culture en moût de bière à environ 25°C .

Grossissement linéaire de 1000 fois.

ai examinées. On admet généralement que les *Torula* ne constituent que de simples phases évolutives de champignons supérieurs; s'il en est ainsi, il faut des conditions spéciales de culture, inconnues jusqu'à ce jour, pour les ramener à leur origine.

3. *Oïdium lactis*.

Mes recherches antérieures sur cette espèce se trouvent exposées surtout dans les deux mémoires cités au chapitre précédent. Les expériences furent pratiquées suivant la même méthode que pour la *Monilia candida* et les *Torula*. Ce que j'ai dit relativement aux rapports entre le système végétatif et les organes de reproduction de la *Monilia candida*, s'applique également à cette espèce: elle ne présente pas de différence morphologique entre les hyphes produisant des conidies et celles formant un mycélium. Dans cette espèce les deux catégories se montrèrent aussi aux températures limites. De même que dans les espèces précédentes, la formation de voile s'arrête un peu avant que le développement ait atteint sa limite. Dans les susdites cultures en moût, la température maxima est près de $37\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$., la température minima au-dessous de $1\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. Par contre, la formation de voile s'arrête à $36\frac{1}{2}$ — $37\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. et à 3°C . environ.

4. *Mucor*.

Les espèces appartenant à ce genre se distinguent par la diversité et la richesse de leurs organes de reproduction: on peut diviser ceux-ci en quatre catégories, à savoir gemmes (chlamydospores), cellules de levure, sporanges et zygospores.

Mes expériences furent faites sur le *Mucor racemosus*, espèce bien connue depuis longtemps, ainsi qu'avec deux espèces nouvelles formant des zygospores et dont j'ai appelé l'une *M. alpinus* et l'autre *M. neglectus*. Ces trois espèces sont des représentants de tous les caractères morphologiques qui se présentent dans ce genre. Le *M. alpinus*, de même que le *M. racemosus*, forment des cellules de levure, mais il ne produit pas d'invertine. Le *M. neglectus* ne forme pas de cellules de levure et appartient, de même que le *M. racemosus*, au petit groupe du genre *Mucor* qui développe de l'invertine; en outre, le *M. neglectus* est le type de tout un groupe inconnu jusqu'ici qui pendant la croissance produit des matières dégageant des odeurs puantes. Les contributions apportées à la physiologie et à la biologie des Mucorinées par les recherches que je vais développer, contiennent également divers renseignements sur les caractères des espèces susnommées, dont je donnerai d'ailleurs une description détaillée dans un travail ultérieur. Dans mon mémoire, cité au chapitre précédent, sur l'action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre, on trouve aussi des recherches sur le *M. racemosus*, avec des renvois à la bibliographie des Mucorinées; à cet égard, je me réfère d'ailleurs à l'ouvrage de Zopf intitulé „Handbuch der Pilze“ et au traité précité de Klebs: „Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze“ III.

Quant à la désignation „formation de gemmes“, d'accord avec la plupart des savants contemporains, je l'ai prise dans son sens le plus étendu, qui la fait comprendre les divers organes appelés aussi oïdies, gemmes proprement dites, gemmes mycéliennes et chlamydospores. Au point de vue de la morphologie, nous ne saurions les distinguer nettement entre eux.

Les gemmes du *M. neglectus* ne produisent pas de bourgeons, puisque, comme je l'ai déjà dit, cette espèce ne possède aucunement ce mode de propagation; mais, par contre, il se trouve dans les gemmes des deux autres espèces. Dans tous les cas, les gemmes ne se développent qu'un temps plus ou moins long après que la formation du mycélium a fait son apparition. Elles apparaissent dans toutes les matières nutritives où la croissance peut avoir lieu, et non seulement à l'intérieur de la substance, mais également dans les mycéliums aériens; il n'est pas même rare de les rencontrer dans les branches sporifères. On les a trouvées sur du pain, dans de la gélatine pure, dans de la gélatine additionnée d'eau de levure, de dextrine ou de différents liquides nutritifs saccharifères (par exemple moût de bière et de vin), sur un milieu fortement saccharifère tel que la gélatine additionnée de 40 pour cent de saccharose, et aussi dans des gélatines nutritives additionnées d'agar-agar, ainsi que dans lesdits liquides nutri-

tifs eux-mêmes. Elles apparaissent comme des membres plus ou moins marqués du système de végétation, et, se détachant, peuvent devenir les centres de formations nouvelles; chez les espèces bourgeonnantes, elles développent aussi bien des tubes germinatifs que des cellules de levure, tandis que dans les autres espèces elles forment seulement des tubes germinatifs. Quant à l'influence de la température sur les quatre organes de reproduction, on en parlera dans un paragraphe unique; voir le tableau donné à la page 104.

Les cellules de levure apparaissent tantôt sous forme d'un développement direct de la spore de sporange, tantôt par un bourgeonnement des gemmes et des cellules normales de mycélium. Les spores chez les espèces bourgeonnantes ont, à l'instar des gemmes, la faculté de développer tant des tubes germinatifs que des cellules de levure, et une seule et même spore peut même développer simultanément les uns et les autres. Ces cellules de levure ont reçu des noms spéciaux: on les appelle tantôt d'après leur forme: „levure sphérique“, tantôt d'après le nom générique des champignons qui les produisent: „levure de Mucor“; dans le présent travail on se sert de l'appellation commune „cellule de levure“.

Nous sommes ici en présence d'un phénomène qui depuis longtemps a attiré l'attention des savants, qui ont émis des opinions différentes sur les conditions auxquelles il doit son apparition. On a notamment mis en avant deux manières principales de voir la chose. Suivant l'une, ladite formation tiendrait à ce que le développement a lieu dans un milieu nutritif fermentescible privé d'air; d'après l'autre, ce serait l'acide carbonique qui agirait sur les cellules. A proprement parler, on n'a pas fait d'expériences véritables pour élucider la question. Dans le mémoire cité plus haut: „Action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre“, j'ai communiqué l'observation que j'avais faite sur certaines espèces qu'elles étaient susceptibles de développer des cellules de levure et des gemmes dans des milieux nutritifs non saccharifères, par conséquent sous des conditions où aucune fermentation alcoolique n'a lieu. Cette observation semble avoir passé inaperçue. Dans ce qui suit, je décrirai des expériences nouvelles et entreprises, en vue d'éclaircir les questions dont il s'agit, sur les deux espèces *Mucor racemosus* et *M. alpinus*.

Je mentionnerai d'abord mes expériences sur le *M. racemosus*. Pour faire celles-ci, je me suis servi des ballons Pasteur à deux cols. Dans la première série, je remplis quelques-uns de ceux-ci d'eau de levure ordinaire, d'autres du même liquide additionné de 10 pour cent de dextrose; la semence était des spores provenant d'une végétation jeune et vigoureuse, et la température de l'expérience était de 25°C.

Après 8 jours de repos, je ne constatai dans l'eau de levure que le développement d'un mycélium normal sans corpuscules reproducteurs. Au bout de 3 mois, beaucoup d'hyphes contenaient une abondante formation de gemmes; les autres corpuscules reproducteurs n'apparurent point. Dans les ballons qui, outre l'eau de levure, contenaient en même temps du dextrose, il se développa non seulement une vigoureuse formation mycélienne, mais encore des gemmes et quelques cellules de levure. Dans ce cas ce fut conséquemment le sucre qui déterminait la formation des cellules de levure.

Dans la seconde série de ces essais, le liquide était saturé d'azote libre d'oxygène, et les ballons étaient également remplis du même gaz. Au reste, quant au dispositif des expériences, voir la description que j'en ai donnée en parlant du genre *Saccharomyces*. Après 5 jours de repos à 25° C., je ne pouvais encore découvrir aucun signe de germination dans la solution pure d'eau de levure, tandis que dans cette solution additionnée de 10 p. c. de dextrose il se forma au contraire rapidement une quantité abondante de cellules de levure, et rien de plus. En introduisant de l'air atmosphérique ou de l'oxygène dans les ballons contenant la solution pure d'eau de levure, j'y trouvai également après 2 jours un fort développement; mais les spores ne germaient que par un tube germinatif et développaient seulement du mycélium. Cet essai montre que, pour pouvoir germer dans de l'eau de levure, les spores exigent de l'oxygène libre, et, de plus, que l'oxygène contenu dans le plasma des spores semées n'y suffisait que quand le liquide contenait du sucre. Alors les spores formaient des cellules de levure, et, de même que dans nos expériences sur les *Saccharomyces*, ces dernières se propageaient dans des circonstances où l'oxygène libre ne pouvait être démontré. Cette partie de la seconde série d'expériences se distingue de la partie correspondante de la première en ce que l'air atmosphérique était exclu; c'est donc là qu'il faut chercher la raison pour laquelle il ne se développe pas autre chose que des cellules de levure.

J'ai fait une expérience analogue dans du moût de bière contenant de l'azote libre d'oxygène. Dans ce cas les spores formèrent également des cellules de levure, et uniquement celles-ci.

Si dans ces cultures, qui présentent un si luxuriant développement de cellules de levure, nous faisons affluer de l'oxygène ou de l'air atmosphérique, le développement prend une autre direction: le bourgeonnement s'arrête, les cellules de levure développent des tubes germinatifs, et une formation de mycélium commence. Si dès le début de nos expériences nous faisons affluer une abondante quantité d'air dans les liquides saccharifères qui renferment les végétations étudiées,

le développement de mycélium s'accroît également au point de prendre le dessus. Il ressort de ces expériences que dans les circonstances indiquées la formation de cellules de levure dépend de l'absence de l'oxygène, et qu'elle n'est point due à l'action directe de l'acide carbonique.

Si l'acide carbonique était la condition déterminante, les spores introduites dans l'eau de levure saturée de ce gaz et isolée avec lui devaient également former des cellules de levure; mais tel n'est point le cas: la germination ne se produit aucunement. D'autre part, aussitôt que nous faisons affluer un peu d'air, la germination commence; mais les spores émettent des tubes germinatifs et forment du mycélium, mais point de cellules de levure; c'est que l'autre facteur: le sucre, fait défaut. Toutes ces expériences nous apprennent que ce n'est pas l'acide carbonique qui détermine la formation des cellules de levure. La valeur que l'acide carbonique contenu dans les liquides qui fermentent peut avoir pour le développement des cellules de levure chez le *Mucor racemosus*, se borne à ce qu'il forme un barrage à l'oxygène. C'est pourquoi, quand il s'agit d'obtenir une végétation de cellules de levure sans cellules mycéliennes, on y parvient simplement en pratiquant la culture dans des matras suffisamment remplis de moût de bière à travers lequel on conduit de l'acide carbonique.

De là nous passons à la seconde espèce formant des cellules de levure: le *Mucor alpinus*. Chez celle-ci, la formation de cellules de levure n'est pas déterminée par la présence du sucre dans le liquide nutritif en question; car elle se produit également dans une solution artificielle telle que celle-ci:

Peptone.....	1 0/0
Phosphate primaire de potassium.....	0,3 0/0
Sulfate de magnium.....	0,5 0/0
Eau.....	98,2 0/0

et dans de l'eau de levure, c'est-à-dire, dans des liquides où nous ne sommes pas en état de démontrer la présence de sucre. Ceci nous fournit un caractère nouveau permettant d'établir des groupes d'espèces dans le genre *Mucor*. Une addition de maltose, de dextrose ou de saccharose aux liquides susnommés, favorise la formation des cellules de levure, mais n'est nullement nécessaire à cela.

Soit que nous fassions la culture dans l'un ou dans l'autre des milieux nutritifs mentionnés ci-dessus, on peut dire en vérité que les cellules de levure se développent en l'absence de l'air; pour la formation mycélienne, c'est le contraire qui est vrai. La condition générale de la formation des cellules de levure, ce n'est pas la présence du

sucré, mais l'absence de l'air, de l'oxygène libre, survenant dans les cultures. Le sucre ne constitue qu'une condition spéciale pour le *M. racemosus* et les espèces apparentées à celle-ci. Dans les liquides mentionnés non sucrés, cette espèce développe, par contre, non seulement des gemmes, mais encore des sporanges. Chez le *M. alpinus* les zygosporos comme tous les autres organes de reproduction apparaissent dans ces circonstances.

Si nous avons soin que l'air n'ait pas accès à nos cultures, nous pouvons continuer la formation des cellules de levure, pour ainsi dire, à l'infini. C'est ainsi que j'ai cultivé le *M. racemosus* durant plus de 9 mois dans des matras contenant du moût de bière fréquemment renouvelé. Aussitôt que j'ai fait affluer abondamment l'air atmosphérique, la formation mycélienne a complètement pris le dessus. En ceci, les cellules de levure du *Mucor* se distinguent d'une manière frappante de celles du *Saccharomyces*. Chez le *Mucor* la formation de cellules de levure se trouve encore à son début; chez plusieurs espèces elle est totalement absente, et là où elle existe, elle n'a pas pris un développement comme chez les *Saccharomyces*. C'est dans les conditions normales d'existence qu'il est plus facile aux espèces de *Mucor* de produire le mycélium que les cellules de levure, tandis que pour les *Saccharomyces* c'est l'inverse qui a lieu. Chacun de ces genres a une direction principale qui lui est propre.

Les gemmes et les cellules de levure du *Mucor* ne forment, pendant des périodes plus ou moins longues, que des échelons de l'évolution végétative et ne se distinguent que très peu des cellules mycéliennes proprement dites. Ce que j'ai dit au chapitre premier de la nature protéique de la cellule de levure du genre *Saccharomyces* et de ses caractères morphologiques en général, s'applique d'une manière générale aussi à la cellule de levure du *Mucor*; seulement, il faut remarquer que tous les essais que j'ai faits pour amener celle-ci à développer des spores dans son intérieur, ont constamment échoué.

D'autre part, le sporange et la zygosporos sont des corpuscules reproducteurs ayant une évolution à part et un caractère morphologique bien accusé; en même temps, l'un et l'autre, en opposition avec les cellules de levure, sont des types aériens bien prononcés. Les gemmes, comme nous l'avons vu, tiennent le milieu entre les deux; elles sont de nature amphibienne et paraissent aussi bien dans l'air que dans des liquides.

Pour que les sporanges et les zygosporos puissent se former, il faut que le développement ait lieu sur un milieu solide, ou, s'il a lieu dans un liquide, la végétation doit pouvoir s'élever jusqu'à la surface et former ici une couche solide d'où les branches mycéliennes qui

doivent développer lesdits organes puissent s'élever dans l'air. Quand la végétation se trouve dans d'épaisses couches de liquide, il est en somme extrêmement difficile pour la plupart des espèces d'arriver à ce développement. Dans les liquides nutritifs sucrés l'acide carbonique développé au cours de la fermentation fera monter le mycélium jusqu'à la surface; ainsi, dans ces conditions la fermentation aide aux efforts de l'espèce pour former lesdits organes de reproduction. S'il se trouve, dans le liquide fermentescible, de la terre, des parties de végétaux ou d'autres particules, il devient encore plus facile pour le mycélium de former le fondement convenable du développement du sporange et de la zygosporé. Toutefois, pour que la fermentation n'entrave pas ladite évolution, il faut que les conditions soient telles que l'acide carbonique développé vienne à être éliminé. Du reste, dans la nature libre il arrivera assez rarement que les cellules se trouvent dans des couches épaisses de liquide saccharifère.

Le sporange apparaît facilement sur tous les milieux ci-dessus mentionnés. Son développement exige une affluence abondante d'air humide et, pour que cet organe puisse se développer vigoureusement, il est nécessaire que la température soit assez élevée.

La zygosporé, on le sait, prend naissance par le fusionnement de deux cellules; on conçoit généralement ce fusionnement comme un processus sexuel, mais on peut cependant aussi l'expliquer d'une autre façon. D'ailleurs, de telles spores apparaissent souvent sans l'intervention d'un pareil fusionnement, et on les appelle alors «azygospores». Dans la suite je me servirai de la désignation zygospores pour l'un et l'autre cas.

La plupart des espèces de *Mucor* ne forment point du tout de zygospores dans nos essais de laboratoire, de quelque façon que nous ayons varié la culture. Ceci est vrai ordinairement même pour les essais faits avec des espèces telles que le *Mucor Mucedo* et d'autres, chez lesquelles on a cependant parfois observé, et comme par hasard, la formation de zygospores. Cependant les conditions nous sont dans tous ces cas restées inconnues jusqu'à ce jour. Comme Brefeld l'a signalé dernièrement (*Jahresber. der schles. Gesellsch. f. vaterländ. Cultur.* Décembre 1900), il ne se trouve parmi les nombreuses Mucorinées examinées jusqu'ici qu'une seule — savoir la *Sporodinia grandis* — chez laquelle la formation de zygospores se présente presque avec la même régularité et avec la même fréquence que les autres organes de reproduction. Chez les autres espèces il la trouva très rarement ou point du tout. Klebs et Falck sont arrivés au même résultat. Nombre de mycologues ont étudié les Mucorinées durant de longues années sans observer une seule fois la formation de zygospores.

On pourrait en conséquence être porté à croire — et c'est une opinion que l'on a émise comme vraisemblable — que la formation de zygosporos était sur le point de disparaître. Au cours de mes recherches sur la circulation des microorganismes dans la nature, je fis l'observation que ladite formation se produit tout au contraire constamment et vigoureusement dans la nature, et que le sol est le lieu où l'on peut toujours trouver des espèces formant des zygosporos. En effet, j'ai pu en constater la présence non seulement dans les échantillons provenant des environs de Copenhague, mais encore dans ceux récoltés dans les montagnes, au Culm du Blocksberg et en d'autres endroits du Harz, comme aussi dans les Alpes, où j'ai pris des échantillons un peu au-dessous de la région des neiges. Le *M. alpinus* provient des Alpes, le *M. neglectus* du Harz.

Quant aux conditions générales de la formation des zygosporos, on peut dire qu'elles sont en général analogues à celles que j'ai énumérées plus haut en parlant de la formation des sporanges; cependant les zygosporos exigent encore plus d'air que les sporanges.

Il présente un certain intérêt de considérer l'ordre suivant lequel les organes reproducteurs apparaissent; dans ce but, nous examinerons d'abord les végétations formées par nos trois espèces dans le moût de bière à 25°C. Les spores qui germent par des tubes germinatifs, commencent d'abord par former un mycélium dans ce liquide; ensuite vient la formation des gemmes et, chez les espèces bourgeonnantes, presque simultanément la formation des cellules de levure. Les spores de ces dernières espèces peuvent aussi, on se le rappelle, entrer immédiatement dans la voie du bourgeonnement, et dans ce cas l'évolution commence par conséquent par la formation de cellules de levure. En tous cas, le sporange et la zygospore viennent en dernier lieu. Pour ces deux organes de reproduction, l'ordre alterne selon les espèces. Chez le *M. alpinus* les sporanges se développent avant les zygosporos, tandis que chez le *M. neglectus* c'est le contraire qui a lieu. Un milieu favorable au développement de sporanges et de zygosporos sont de minces couches de gélatine au moût de bière ou de cette substance additionnée d'agar-agar, exposées à une température de 25°C. Dans ces conditions le *M. alpinus* forme de nombreux sporanges au bout de 3 jours, mais pas encore de zygosporos; celles-ci ne se montrèrent que 1 ou 2 jours plus tard. Par contre, chez le *M. neglectus* j'ai trouvé déjà après 2 à 3 jours un riche développement de zygosporos, tandis que les sporanges n'apparurent que 2 jour après.

Aussi bien que la formation de gemmes et de cellules de levure, le mycélium peut également se développer à l'infini sans que les organes supérieurs de reproduction se présentent; en ce sens, l'une de

ces formes d'évolution ne dépend pas de l'autre. J'ai déjà mentionné dans ce qui précède que durant plus de 9 mois j'ai fait engendrer des cellules de levure en renouvelant fréquemment le liquide nourricier, et qu'au moment où l'essai fut interrompu la formation de sporanges apparut immédiatement avec la force ordinaire, comme s'il ne s'était produit rien de particulier.

La formation de gemmes est fortement développée chez les trois espèces qui nous occupent, et chez deux d'entre elles en même temps la formation des cellules de levure. Qu'il y ait un développement un peu plus fort ou un peu plus faible des organes inférieurs de reproduction, ne semble pas avoir une influence sur le développement des organes supérieurs. La considération de nos trois espèces paraît indiquer que dans les rapports entre la formation des sporanges et celle des zygosporos il y a lutte pour la place et pour les conditions de la vie. C'est un fait également connu pour les autres Champignons que les Mucorinées peuvent, elles aussi, être dirigées dans des directions exclusives d'évolution, de sorte que dans l'un cas c'est la formation de sporanges, dans l'autre celle de zygosporos qui prédomine. Sous ce rapport, les *M. racemosus* et *M. neglectus* forment les points extrêmes; la première de ces deux espèces produit très vigoureusement des sporanges, mais d'un autre côté elle est en même temps du nombre de celles que nous ne pouvons pas amener à développer une seule zygospore; la seconde, par contre, se distingue par son abondante formation de zygosporos, mais ne produit que peu de sporanges. Au milieu se trouve le *M. alpinus*.

Enfin nous considérerons les recherches relatives à l'influence de la température. Dans ces expériences j'ai pris comme semence des spores provenant de végétations jeunes et vigoureuses; le milieu nourricier était de la gélatine au moût de bière et additionnée d'agar-agar, en couches minces, et du moût, par couches en partie minces, en partie épaisses; l'une et l'autre substance étaient renfermées dans des flacons Freudenberg; le tube du capuchon de ceux-ci n'avait pas de coton, mais était prolongé par un tube courbé. Je pris soin que dans l'étuve il se trouvât une température constante et de l'air humide. Le but est de faire les expériences sous les conditions les plus favorables au développement des organes en question. Pour le mycélium et pour les cellules de levure, ces conditions sont à un degré éminent présentes dans le moût de bière, et il en est de même pour cette formation de chlamydo-spores qui se produit ici chez les espèces bourgeonnantes et que l'on a parfois dénommée gemmulation mycélienne. Sur le milieu solide, les conditions sont au contraire particulièrement favorables aux organes supérieurs de reproduction et également à la pro-

On pourrait en conséquence être porté à croire — et c'est une opinion que l'on a émise comme vraisemblable — que la formation de zygosporos était sur le point de disparaître. Au cours de mes recherches sur la circulation des microorganismes dans la nature, je fis l'observation que ladite formation se produit tout au contraire constamment et vigoureusement dans la nature, et que le sol est le lieu où l'on peut toujours trouver des espèces formant des zygosporos. En effet, j'ai pu en constater la présence non seulement dans les échantillons provenant des environs de Copenhague, mais encore dans ceux récoltés dans les montagnes, au Culm du Blocksberg et en d'autres endroits du Harz, comme aussi dans les Alpes, où j'ai pris des échantillons un peu au-dessous de la région des neiges. Le *M. alpinus* provient des Alpes, le *M. neglectus* du Harz.

Quant aux conditions générales de la formation des zygosporos, on peut dire qu'elles sont en général analogues à celles que j'ai énumérées plus haut en parlant de la formation des sporanges; cependant les zygosporos exigent encore plus d'air que les sporanges.

Il présente un certain intérêt de considérer l'ordre suivant lequel les organes reproducteurs apparaissent; dans ce but, nous examinerons d'abord les végétations formées par nos trois espèces dans le moût de bière à 25°C. Les spores qui germent par des tubes germinatifs, commencent d'abord par former un mycélium dans ce liquide; ensuite vient la formation des gemmes et, chez les espèces bourgeonnantes, presque simultanément la formation des cellules de levure. Les spores de ces dernières espèces peuvent aussi, on se le rappelle, entrer immédiatement dans la voie du bourgeonnement, et dans ce cas l'évolution commence par conséquent par la formation de cellules de levure. En tous cas, le sporange et la zygosporo viennent en dernier lieu. Pour ces deux organes de reproduction, l'ordre alterne selon les espèces. Chez le *M. alpinus* les sporanges se développent avant les zygosporos, tandis que chez le *M. neglectus* c'est le contraire qui a lieu. Un milieu favorable au développement de sporanges et de zygosporos sont de minces couches de gélatine au moût de bière ou de cette substance additionnée d'agar-agar, exposées à une température de 25°C. Dans ces conditions le *M. alpinus* forme de nombreux sporanges au bout de 3 jours, mais pas encore de zygosporos; celles-ci ne se montrent que 1 ou 2 jours plus tard. Par contre, chez le *M. neglectus* j'ai trouvé déjà après 2 à 3 jours un riche développement de zygosporos, tandis que les sporanges n'apparaissent que 2 jour après.

Aussi bien que la formation de gemmes et de cellules de levure, le mycélium peut également se développer à l'infini sans que les organes supérieurs de reproduction se présentent; en ce sens, l'une de

ces formes d'évolution ne dépend pas de l'autre. J'ai déjà mentionné dans ce qui précède que durant plus de 9 mois j'ai fait engendrer des cellules de levure en renouvelant fréquemment le liquide nourricier, et qu'au moment où l'essai fut interrompu la formation de sporanges apparut immédiatement avec la force ordinaire, comme s'il ne s'était produit rien de particulier.

La formation de gemmes est fortement développée chez les trois espèces qui nous occupent, et chez deux d'entre elles en même temps la formation des cellules de levure. Qu'il y ait un développement un peu plus fort ou un peu plus faible des organes inférieurs de reproduction, ne semble pas avoir une influence sur le développement des organes supérieurs. La considération de nos trois espèces paraît indiquer que dans les rapports entre la formation des sporanges et celle des zygosporos il y a lutte pour la place et pour les conditions de la vie. C'est un fait également connu pour les autres Champignons que les Mucorinées peuvent, elles aussi, être dirigées dans des directions exclusives d'évolution, de sorte que dans l'un cas c'est la formation de sporanges, dans l'autre celle de zygosporos qui prédomine. Sous ce rapport, les *M. racemosus* et *M. neglectus* forment les points extrêmes; la première de ces deux espèces produit très vigoureusement des sporanges, mais d'un autre côté elle est en même temps du nombre de celles que nous ne pouvons pas amener à développer une seule zygospore; la seconde, par contre, se distingue par son abondante formation de zygosporos, mais ne produit que peu de sporanges. Au milieu se trouve le *M. alpinus*.

Enfin nous considérerons les recherches relatives à l'influence de la température. Dans ces expériences j'ai pris comme semence des spores provenant de végétations jeunes et vigoureuses; le milieu nourricier était de la gélatine au moût de bière et additionnée d'agar-agar, en couches minces, et du moût, par couches en partie minces, en partie épaisses; l'une et l'autre substance étaient renfermées dans des flacons Freudenberg; le tube du capuchon de ceux-ci n'avait pas de coton, mais était prolongé par un tube courbé. Je pris soin que dans l'étuve il se trouvât une température constante et de l'air humide. Le but est de faire les expériences sous les conditions les plus favorables au développement des organes en question. Pour le mycélium et pour les cellules de levure, ces conditions sont à un degré éminent présentes dans le moût de bière, et il en est de même pour cette formation de chlamydosporos qui se produit ici chez les espèces bourgeonnantes et que l'on a parfois dénommée gemmulation mycélienne. Sur le milieu solide, les conditions sont au contraire particulièrement favorables aux organes supérieurs de reproduction et également à la pro-

duction de gemmes, particulièrement pour la forme qui parfois s'appelle gemmes ou chlamydospores proprement dites. Les cultures dans ces deux substances se suppléent mutuellement. Pour que les zygo-spores et les sporanges puissent se produire, il faut qu'un mycélium aérien se développe. Il n'en apparaît ordinairement pas quand le milieu nourricier est couvert d'eau, même quand il n'y a qu'une couche fort mince. Voilà de quoi il faut se rendre bien compte dans ces expériences. De plus, il faut aussi se rappeler que les quatre catégories d'organes de reproduction apparaissent dans des temps différents, et qu'aux températures limites il peut y avoir de longs intervalles entre leur apparition. Aux températures élevées, la culture se fit dans le courant de 3 semaines; mais aux températures basses il fallut plus de 5 mois. Il va sans dire que pour ces recherches on se sert du microscope, et pour les zygosporos en outre d'une loupe. Quand les zygosporos sont rares, on ne peut souvent les découvrir qu'à l'aide de ce dernier instrument. Du moins pour la recherche préalable, la loupe est de beaucoup préférable au microscope.

Ci-dessous le tableau des résultats qu'ont donnés mes analyses :

	Maximum de température		Minimum de température	
	Mont de bière	Gélatine au mont de bière et additionnée d'agar-agar	Mont de bière	Gélatine au mont de bière et additionnée d'agar-agar
Mucor racemosus:				
Mycélium	32—33° C.	32—33° C.	1/2° C.	1/2° C.
Cellules de levure ..	32° -	32° -		
Gemmes	32° -	32° -		1/2° -
Sporanges.....		31—32° -		3—1/2° -
Mucor alpinus:				
Mycélium	29—31° -	29—31° -	1/2° -	1/2° -
Cellules de levure ..	29—31° -	29—30° -	1/2° -	1/2° -
Gemmes	29—31° -	29—30° -	1/2° -	1/2° -
Sporanges.....		27° -		1—1/2° -
Zygosporos.....		25—26° -		3° -
Mucor neglectus:				
Mycélium	33° -	33° -	3° -	3° -
Gemmes	30—31° -	32° -	3—4° -	3—4° -
Sporanges.....		29° -		3—4° -
Zygosporos.....	32° -	32° -		3—4° -

Chacune des espèces avait dans ces deux substances les mêmes températures limites pour la croissance végétative. La température

maxima la plus élevée était de 33° C., la température minima la plus basse, de 1/3° C. En comparant les espèces, nous trouvons, comme nous devons nous y attendre, que leurs températures limites forment des caractères capables de servir à les distinguer entre elles.

Les formations de gemmes et de cellules de levure, peuvent se présenter aux températures limites pour le développement végétatif ou dans le voisinage de ces températures: c'est que, en effet, ces formations se rapprochent beaucoup du système végétatif. Toutefois, la formation de cellules de levure chez le *M. racemosus* ne semble pas avoir lieu aux températures les plus basses; en tout cas, dans une assez grande série de cultures, je n'ai pu les observer à des températures inférieures à 6° C. En somme, il existe une grande irrégularité dans l'apparition des gemmes et des cellules de levure près des températures limites, et cela a lieu aussi bien du côté des maxima que de celui des minima. Il arrive souvent que les organes de reproduction proprement dits: sporanges et zygosporos, se sont développés ici sans signe apparent que les chlamydosporos et les cellules de levure allaient apparaître.

Pour toutes les trois espèces, la température maxima pour la formation des sporanges et des zygosporos est un peu inférieure à la température maxima de la croissance végétative, de sorte qu'il y a concordance avec les observations que j'ai faites antérieurement sur d'autres champignons. La température minima pour les deux organes susnommés chez le *Mucor neglectus* est très rapprochée de la température minima de la croissance végétative, tandis que pour les deux autres espèces il se manifeste sous ce rapport une différence nettement prononcée. En ce qui concerne les relations entre les températures limites des organes supérieurs de reproduction, le tableau montre que ces relations alternent selon les espèces. La formation de sporanges chez le *M. alpinus* a une température maxima supérieure à celle des zygosporos, tandis que chez le *M. neglectus* c'est l'inverse qui a lieu.

Les tableaux donnent un aperçu de mes expériences principales; à côté de celles-ci, j'ai également fait des essais avec les trois espèces sur du moût de bière additionné de 14 pour cent de gélatine, mais seulement aux températures basses, puisque cette substance se fond aux températures plus élevées, — et avec les *M. racemosus* et *M. alpinus* sur du pain de seigle presque aux mêmes températures que celles indiquées dans le tableau. Le pain se prête moins bien à des expériences principales, parce que, surtout aux hautes températures, la formation de zygosporos ne se produit pas ici avec vigueur. La gélatine

au moût de bière fut, de même que le moût de bière additionné non seulement de gélatine mais encore d'agar-agar, placé par minces couches dans les flacons mentionnés. Le pain remplissait, par contre, un quart du flacon. Au reste, ces essais furent réalisés suivant le même procédé que ceux exposés précédemment.

Sur le pain, la croissance végétative des *M. racemosus* et *M. alpinus* eut une température maxima un peu plus basse que sur la gélatine au moût additionnée d'agar-agar et dans le moût, mais la même température minima, savoir $1\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. Le minimum de température pour le développement de ces deux espèces sur la gélatine au moût se trouve également être de $1\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. Le *M. neglectus*, sur la gélatine au moût avait sa limite minimum à 3°C . Par conséquent, cette espèce, elle aussi, avait ici le même minimum de température que sur la gélatine au moût additionnée d'agar-agar et dans le moût. Les énoncés dérivés de mes expériences, avec la gélatine au moût additionnée d'agar-agar et avec le moût, furent confirmées par les essais faits avec le pain et avec la gélatine au moût. Le résultat le plus important apportés par ces derniers fut qu'ici il se manifesta encore plus clairement que dans la première série que les organes supérieurs de reproduction peuvent dans certaines conditions de culture se développer au minimum de température pour la croissance végétative. Ainsi, dans les cultures faites sur le pain, les *M. racemosus* et *M. alpinus* avaient une température minima, tant pour la formation des sporanges que pour celle du mycélium, d'environ $1\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$., et il en était de même pour la dernière espèce dans la culture sur la gélatine au moût.

Les températures limites de la croissance végétative et du développement du sporange chez le *M. racemosus* ont aussi été déterminées par Klebs et enregistrées dans son travail cité plus haut. Cet auteur trouva que pour la croissance la température maxima est de $32-33^{\circ}\text{C}$. et la température minima de $4-5^{\circ}\text{C}$., et que pour la formation des sporanges le maximum de température se trouve être $30-31^{\circ}$, le minimum de $6-7^{\circ}\text{C}$. Comme milieu nutritif il employa du moût de raisins additionné d'agar-agar. La description qu'il donne de ladite espèce concorde avec mes observations; il en est de même aussi, pour le fond, quant aux températures maxima trouvées par lui; mais en ce qui concerne les températures minima, il y a au contraire une très grande différence, aussi quand la comparaison se borne à la substance qui dans mes analyses avait la plus grande analogie avec la sienne, à savoir la gélatine au moût de bière additionnée d'agar-agar. Suivant Klebs, il n'y a pas de croissance à une température inférieure à 4°C ., tandis que dans mes expériences elle se continuait encore à

$1/2^{\circ}\text{C}$. Dans celles faites par moi sur la gélatine au moût additionnée d'agar-agar, la formation de sporanges se produisait encore à 3°C . et une fois même au-dessous, tandis que chez Klebs elle s'arrêtait déjà à 6°C . La raison de ces grandes différences se trouve sûrement dans le fait qu'il a interrompu ses expériences à une phase prématurée. Ayant constaté que la formation de sporanges ne se montrait pas à $4-5^{\circ}\text{C}$. après 8 jours, il en conclut qu'elle ne se produira plus du tout; mais cela n'est pas exact. Le développement aux températures basses se fait beaucoup plus lentement; il y a ici dans ces recherches un élément qui en augmente à un haut degré la difficulté, mais que nous devons prendre en très grande considération. Je trouvai qu'à basse température l'analyse ne peut, en règle générale, être terminée qu'après un temps variant entre 5 et 6 mois.

J'ai mentionné dans le premier chapitre du présent mémoire comment les recherches que j'ai faites en 1886 donnèrent pour résultat que la température maxima de la croissance végétative des *Saccharomycètes* est supérieure à celle de la formation des spores. Les essais que je fis pour m'orienter sur d'autres groupes de champignons, me firent penser qu'il y avait là une règle générale s'appliquant à l'ensemble des Champignons; je mis en avant cette idée dans mon travail précité sur l'*Anixiopsis*. Dans son traité sur la physiologie des organes de reproduction chez les Champignons, Klebs adopta cette hypothèse en lui donnant de suite une extension considérable: il posa en règle générale que l'organe relativement plus compliqué de reproduction aurait une température maxima plus basse que l'organe plus simple. En ce qui concerne les *Mucorinées*, il entend par la première de ces expressions la zygospore, et par la seconde le sporange. Cependant, pour prouver la justesse de son assertion, il ne peut s'appuyer que sur un cas unique, à savoir les essais qu'il a faits sur la *Sporodinia grandis*. Chez le *M. racemosus* la formation de zygospores, on se le rappelle, ne se produisait pas du tout. Quant au minimum de température, il est porté à croire que des règles correspondantes se trouveront également valables.

Mes expériences ci-dessus décrites sur les *M. racemosus*, *M. alpinus* et *M. neglectus*, n'ont pas confirmé l'exactitude de l'opinion de Klebs, mais ont montré qu'il faut ramener la thèse à la forme que je lui ai donnée. Ce n'est qu'ainsi qu'elle peut avoir une application générale.

Avril 1902.

Dosage de petites quantités d'arsenic dans les matières organiques, spécialement dans la bière et dans le moût.

Examen comparé des méthodes diverses de doser l'arsenic.

Par

Carl Pedersen.

En l'automne de 1900, un assez grand nombre de personnes en Angleterre et au pays de Galles qui avaient pris des bières fortement arsénicales, furent empoisonnées. Au mois de février 1901, une commission royale fut nommée dans le but de faire une enquête sur ces cas très sérieux d'empoisonnement. M. Whitelegge, membre de cette commission, s'est adressé à M. Harald Faber, conseiller agronomique du Danemark à Londres, pour obtenir, par son intermédiaire, des renseignements sur l'expérience faite en Danemark à l'égard de la bière arsénicale. M. Faber s'étant adressé à la brasserie de Gamle Carlsberg, la direction de la brasserie a demandé à la section de chimie du Laboratoire de Carlsberg de faire des recherches à ce sujet.

Par suite de cette demande M. S.-P.-L. Sørensen, chef de la section, m'a chargé d'entreprendre une série de recherches dont voici les résultats:

1. Introduction.

La détermination de l'arsenic dans les matières organiques se fait naturellement au moyen de deux opérations: 1° la séparation de l'arsenic d'avec les matières organiques; 2° le dosage de l'arsenic.

Les différentes méthodes proposées pour séparer l'arsenic de la matière organique se divisent en trois groupes principaux:

1° La méthode d'oxydation: on oxyde la matière organique au moyen d'agents d'oxydation vigoureux, dont les plus importants sont

le permanganate de potassium, l'acide sulfurique concentré, l'acide nitrique et l'acide sulfurique forts, le chlorate de potassium et l'acide chlorhydrique, ou, par voie sèche, la fusion avec du salpêtre.

2° La méthode de précipitation de Reinsch¹⁾: on précipite l'arsenic de la solution qui contient les matières organiques en faisant bouillir le liquide chlorhydraté avec du cuivre poli. Pendant l'ébullition l'arsenic se déposera sur le cuivre comme un dépôt noir.

3° La méthode de distillation (MM. Schneider et Fyfe²⁾, modifiée par MM. E. Fischer³⁾, Hager⁴⁾, et d'autres): en faisant bouillir la matière à analyser avec l'acide chlorhydrique et le protochlorure de fer l'arsenic se dégage par distillation sous la forme de trichlorure d'arsenic.

Après avoir séparé l'arsenic de la matière organique par un de ces procédés, on le caractérise et le dose de différentes manières: le plus souvent dans l'appareil Marsh-Berzelius ou l'appareil Fresenius-Babo⁵⁾, quelquefois par précipitation avec de l'hydrogène sulfuré, plus rarement par d'autres procédés.

En combinant ces méthodes, il s'est développé, peu à peu, un nombre de procédés généralement reconnus pour ces recherches aux différents pays.

En Danemark, on suit, en grande partie, pour reconnaître l'arsenic, les règles adoptées par la Chemisk Forening (la Société de chimie) de Copenhague le 28 mai 1886⁶⁾. On oxyde les matières organiques et les détruit soit en chauffant avec du chlorate de potassium et de l'acide chlorhydrique, soit en fondant avec de l'azotate de potassium, soit, ce qui est le plus facile, par le procédé indiqué par M. H. Reddelien⁶⁾, en faisant agir, à la température ambiante, sur la matière à oxyder du permanganate de potassium solide et de l'acide sulfurique concentré. Quelle que soit la méthode appliquée pour la destruction des matières organiques, on met la liqueur qui en résulte dans un appareil de Marsh d'une construction particulière.

En Allemagne⁷⁾, la loi du 10 avril 1888 prescrit un procédé à suivre pour reconnaître l'arsenic et l'étain dans les aliments: on oxyde la matière avec du chlorate de potassium et de l'acide chlorhydrique; on précipite la solution avec de l'hydrogène sulfuré. Le trisulfure d'arsenic précipité est dissous dans du sulfure d'ammonium

¹⁾ Journ. f. pr. Chem. XXIV, 244 (1841).

²⁾ Journ. f. pr. Chem. LV, 103 (1852).

³⁾ Ber. d. deutsch. chem. Gesell. XIII, 1778 (1880).

⁴⁾ Ref. Zeitschr. f. anal. Chem. XXI, 308 (1882).

⁵⁾ W. Fresenius: Zeitschr. f. anal. Chem. XX, 522 (1881).

⁶⁾ Tidsskrift for Physik og Chemi VII, 130 (1886).

⁷⁾ Zeitschr. f. anal. Chem. XXVII, 471 (1888).

jaune. La solution obtenue est traitée avec de l'acide azotique concentré, et évaporée à sec. Le résidu est fondu avec du carbonate de sodium et du salpêtre. On précipite l'extrait aqueux avec du molybdate d'ammonium. Le précipité est dissous dans de l'ammoniaque liquide étendue. La solution est précipitée avec du chlorure ammoniaco-magnésien. Le précipité d'arséniate ammoniaco-magnésien est dissous dans un peu d'acide azotique étendu. Pour reconnaître l'arsenic, on se sert de l'azotate d'argent, qui donne un précipité brun rouge d'arséniate d'argent, ou bien on rend une goutte de la solution, placée sur une lame porte-objet, faiblement alcaline avec de l'ammoniaque. Si la solution contient de l'arsenic, il se formera, sous peu, un précipité cristallin d'arséniate ammoniaco-magnésien et qui est facilement reconnaissable sous le microscope.

En Suède¹⁾, pour reconnaître l'arsenic, on applique, suivant la loi du 10 avril 1885, la méthode de distillation avec de l'acide chlorhydrique et du protochlorure de fer. On précipite la liqueur distillée avec de l'hydrogène sulfuré, et la sulfure d'arsenic est réduit avec du cyanure de potassium et du carbonate de sodium d'après le procédé de Fresenius et de Babo.

En Angleterre, pour les recherches étendues de bières faites, depuis quelques années, pour y reconnaître l'arsenic, on s'est servi surtout de méthodes donnant des résultats en peu de temps et sans trop de peine. Ainsi MM. A. Chapman²⁾, Alfred H. Allen³⁾, E. Jones⁴⁾ et The Commission to the Manchester Brewers' Association⁵⁾ ont indiqué différentes méthodes qui, toutes, ont recours, d'après Reinsch, au dépôt d'arsenic fait sur du cuivre poli, en portant à l'ébullition la bière arsénicale avec une toile métallique de cuivre poli. On caractérise l'arsenic déposé tantôt par sublimation à l'état d'anhydride arsénieux, reconnaissable sous le microscope (MM. Chapman, Allen et Commission), tantôt par pesage à l'état de sulfure (M. E. Jones). MM. W. Thomson et J. P. Shenton⁶⁾, au contraire, oxydent la bière au moyen d'acide nitrique et d'acide sulfurique concentrés. Après avoir évaporé l'acide nitrique, ils introduisent la solution dans l'appareil de Marsh. Enfin M. F. C. J. Bird⁷⁾, en recherchant l'arsenic dans la bière, a employé la réaction de Gutzeit avec du chlorure mercurique.

¹⁾ Zeitschr. f. anal. Chem. XXXIV, 88 (1895).

²⁾ The Analyst, XXVI, 8 (1901).

³⁾ ibid. XXVI, 10 (1901).

⁴⁾ ibid. Ref. XXVI, 158 (1901).

⁵⁾ ibid. XXVI, 13 (1901).

⁶⁾ ibid. Ref. XXVI, 213 (1901).

⁷⁾ ibid. XXVI. 181 (1901).

Après avoir appliqué exactement ces méthodes à quelques essais d'orientation et de comparaison préalables, faits avec de la bière dans laquelle ont été introduites des quantités connues d'arsenic, j'ai bien vite reconnu que tous ces procédés n'étaient pas également exacts les résultats en variant beaucoup. C'est ce que confirment aussi les résultats publiés par la Royal Commission on Arsenical Poisoning, nommée à l'occasion des empoisonnements par l'arsenic très graves en Angleterre.

Voici ce qu'on lit dans le rapport officiel de la Commission, remis au Gouvernement:

„Conclusion as to the exact amount of arsenic present in the inculpatated beers is rendered difficult by the fact that different analysts have employed different methods which in some instances have produced very divergent results when applied to samples of the same beer. We propose to make further inquiry into the relative value of different quantitative tests for arsenic in beer, as to the most trustworthy methods to recover all the arsenic present in a given sample of beer, and as to the possible existence of arsenic in beer in some combination with organic matter in which it might escape determination by certain of the tests commonly employed.“

A mon avis les pages suivantes contribueront à la solution des questions posées dans ce rapport¹⁾.

2. L'appareil de Marsh.

Avant de juger par des expériences les différents procédés pour séparer l'arsenic des matières organiques, il était nécessaire de choisir une méthode de caractérisation de l'arsenic le plus quantitative possible. Il fallait une méthode dont les réactions se fissent suivre et contrôler facilement. La méthode une fois établie, sa précision et sa sensibilité trouvées, il serait possible de comparer les valeurs relatives des procédés différents pour doser l'arsenic dans les matières

¹⁾ Après que ces recherches étaient, pour la plus grande partie, terminées, un traité a paru dans le journal „The Analyst“ XXVII, 48 (1902) sous le titre suivant: „Report of the conjoint Committee on the Detection and approximate Estimation of minute Quantities of Arsenic in Beer, Brewing Materials, Food-stuffs and Fuels.“ Il s'ensuit de ce rapport que le Comité, composé de MM. Otto Hehner, Alfred H. Allen, Alfred C. Chapman, C. Estcourt, David Howard, Arthur R. Ling, Rudolph Messel, Leonard T. Thorne, a choisi, comme le meilleur procédé, une méthode assez semblable à celle dont je me suis servi. Les écarts des deux méthodes ressortiront des observations faites plus loin (voir pp. 114, 124).

organiques. On trouverait ainsi la méthode de dosage la plus exacte parmi celles qu'on aura soumises à l'examen.

Parmi les méthodes pour rechercher des quantités minimales d'arsenic, au-dessous d'un milligramme; le procédé de Marsh-Berzelius et celui de Fresenius-Babo sont les plus en usage. Ils présentent l'avantage d'être simples et d'exécution facile, et les dimensions de l'anneau d'arsenic donnent d'une manière excellente la mesure de la quantité d'arsenic.

De ces méthodes, celle de Marsh-Berzelius est la plus expéditive et la plus commode quand l'arsenic se trouve en solution. C'est aussi la méthode qui sert de base à ce travail.

En se servant de l'appareil de Marsh il importait, tout d'abord, d'examiner les éléments qui en déterminent la sensibilité et l'application sûre. En effet, pour pouvoir servir au dosage de l'arsenic l'appareil doit toujours donner des anneaux d'arsenic de dimensions absolument égales pour les mêmes quantités d'arsenic des essais parallèles. C'est là un fait que, jusqu'à présent, on n'a pas suffisamment reconnu. Avec un tel appareil on pourrait former, au moyen de quantités connues d'arsenic, une échelle d'anneaux d'arsenic qui pût servir de module aux recherches postérieures.

L'appareil de Marsh le plus convenable et le mieux fait pour satisfaire aux conditions exposées plus haut est l'appareil modifié représenté ci-dessous et auquel on a donné la forme adoptée par la Chemisk Forening de Copenhague en 1886¹⁾.

Pour produire le dégagement de l'hydrogène on se sert d'un flacon ordinaire de 300^{cc}, fermé d'un bouchon de caoutchouc à deux trous. L'un des trous reçoit un entonnoir séparateur à robinet de 100^{cc}, l'autre reçoit un tube à dégagement, par où s'échappe l'hydrogène.

L'hydrogène se débarrasse des gouttelettes d'eau qu'il peut entraîner en passant par de l'acide sulfurique contenu dans une éprouvette à pied haute de 12^{cm} et qui est munie d'un bouchon de caoutchouc²⁾ à deux trous qui reçoivent le tube adducteur et le tube abducteur de l'hydrogène.

De là, on fait passer l'hydrogène et l'hydrogène arsénié à travers le tube d'essai, tube de verre peu fusible de 10^{mm} de diamètre. Une portion de ce tube est étranglée ayant 3^{mm} de diamètre à l'extérieur. Au moyen d'un bec Bunsen on maintient au rouge sombre

¹⁾ Loc. cit.

²⁾ On s'est assuré, par des essais, que l'emploi de bouchons de caoutchouc ne présente aucun inconvénient. Avant l'usage les bouchons, ainsi que les tubes de caoutchouc, ont été lavés à la lessive de soude.

la partie du tube immédiatement devant l'endroit étranglé. Pour concentrer la chaleur, le bec est muni d'un couronnement à jet éventail et d'une cheminée en terre percée en deux endroits diamétralement opposés et par où on fait passer le tube d'essai.

L'usage de l'appareil démontrait qu'il est très important de maintenir au rouge sombre le tube d'essai, sans pourtant chauffer de manière à le faire fondre, ce qui arrivera facilement si on donne toute la



flamme. En effet, si le tube n'est pas maintenu au rouge, la décomposition de l'hydrogène arsénié en arsenic et en hydrogène est incomplète. C'est ce qui arrivait quand on avait placé le tube d'essai assez bas pour lui faire toucher la partie froide de la flamme du bec. Pour empêcher la pointe du tube de s'incliner pendant le chauffage, on le soutient ainsi que fait voir la figure.

Nous avons déjà dit que, pour dessécher l'hydrogène, on se sert de l'acide sulfurique concentré. On sait que cet acide décompose l'hydrogène arsénié en hydrogène et en arsenic, prenant en même temps une teinte brune. C'est pour cette raison, sans doute, que des chimistes ont proposé l'emploi du chlorure de calcium ou d'un mélange de chlorure de calcium et d'hydrate de potassium solide pour opérer la dessiccation¹⁾.

Pour décider la question : laquelle de ces trois méthodes de des-

¹⁾ R. Otto: Anleitung zur Ausmittlung der Gifte. Braunschweig 1896. P. 187.

siccation est la meilleure, on a fait les essais parallèles suivants, en plaçant les dessiccatifs solides dans des tubes en U. Les conditions étaient identiques. Le dégagement de l'hydrogène se faisait au moyen de zinc et d'acide sulfurique mis dans le flacon de dégagement.

Le flacon de dégagement contenait ¹⁾	La dessiccation de l'hydrogène se faisait au moyen		
	d'acide sulfurique concentré	de chlorure de calcium	d'un mélange de chlorure de calcium et d'hydrate de potassium
$\frac{1}{100}$ mg d'As	anneau d'arsenic bien prononcé	—	—
$\frac{1}{50}$ mg d'As.	anneau d'arsenic plus distinct	teinte brune à peine visible	pas de trace
$\frac{1}{30}$ mg d'As.	anneau d'arsenic encore plus distinct	anneau brun bien prononcé dans la portion étranglée du tube	trace à peine visible

Ces essais, qui ont été répétés avec le même résultat, ont démontré à l'évidence que l'acide sulfurique concentré est bien préférable, comme agent de dessiccation, aux deux corps solides, qui retenaient des quantités considérables d'hydrogène arsénié. L'acide sulfurique présente encore un avantage. Il permet de suivre et de contrôler la vivacité du dégagement de l'hydrogène, ce qui est une condition essentielle pour obtenir l'uniformité des essais. Les agents solides, au contraire, ne donnaient aucune indication de la marche trop vive du dégagement d'hydrogène ni de son arrêt complet. Enfin, si on emploie l'acide sulfurique, l'anneau d'arsenic se dépose toujours au même endroit du tube, et ce dépôt est plus uniforme qu'à l'emploi des agents solides. Mais plus le dépôt est régulier, plus il est facile de comparer les différents anneaux d'arsenic.

Les essais ont été faits de la manière suivante: après avoir introduit dans le flacon de dégagement d'hydrogène 20^{gr} de zinc pur, on y ajouta, par l'entonnoir séparateur, cinq gouttes d'une solution de sulfate de cuivre normale et puis après 100^{cc} d'acide sulfurique²⁾

¹⁾ Dans ces expériences, ainsi que dans tous les essais suivants, on additionnait l'arsenic sous la forme d'une solution aqueuse d'anhydride arsénieux. La solution contenait $\frac{1}{100}$ milligramme d'As dans 1 centimètre cube, donc 0.^{gr}01 d'As = 0.^{gr}0132 d'anhydride arsénieux (As⁴ O³) dans 1 litre.

²⁾ Le Conjoint Committee déjà nommé, au contraire, se sert d'acide chlorhydrique pour produire le dégagement d'hydrogène dans l'appareil

étendu (1 volume d'acide sulfurique concentré + 7 volumes d'eau). Au bout de 13 minutes on alluma le bec de gaz; au bout de 15 ou 16 minutes on additionna la solution arsénicale par l'entonnoir séparateur. Au bout d'une heure et demie on arrêta l'expérience, tout l'hydrogène arsénié étant chassé de l'appareil.

Pour ces essais on n'employait que du zinc pur; pour s'assurer d'un produit absolument uniforme, le zinc était fondu et granulé. L'acide sulfurique était l'acide pur du commerce. A chaque nouvelle série d'essais on faisait, en même temps, un dosage de contrôle avec le zinc et l'acide sulfurique seuls. Ces dosages de contrôle ne donnaient qu'une trace à peine visible d'anneau d'arsenic et qui était de beaucoup plus petite que celle correspondant à $1/100^{\text{me}}$ d'As. Néanmoins ces dosages de contrôle doivent toujours se faire pour pouvoir entrer en compte, s'il y a lieu.

L'acide sulfurique n'attaquant pas le zinc pur, on avait recours à différents moyens pour mettre en train le dégagement d'hydrogène: on additionnait du sulfate de cuivre, de l'acide chloroplatinique, du fer. Dans ce dernier cas, on fondait le zinc avec de la poudre de fer en agitant avec une barre de fer. Les autres réactifs étaient introduits au flacon de dégagement.

Voici les résultats des essais faits avec ces méthodes en employant, à chaque essai, $1/10^{\text{me}}$ d'As:

1) Avec du sulfate de cuivre:

Nos. d'ordre	Addition de Cu SO_4 normal	Le dégagement d'hydrogène était en bon train	Le dégagement d'hydrogène était	L'anneau d'arsenic était
1	2 gouttes	au bout de 30 minutes	régulier	plus petit qu'en 2
2	5 —	- — - 13 —	beau, régulier	le plus grand
3	20 — = 1 ^{cc}	- — - 10 —	assez vif	égal à 1
4	5 ^{cc}	- moins - 10 —	trop vif	moins grand qu'en 1 (odeur forte d'hydrogène arsénié)

de Marsh ayant trouvé qu'en se servant de l'acide chlorhydrique on est, en général, à même d'essayer directement dans l'appareil de Marsh une solution contenant des matières organiques. Il déclare encore avoir obtenu un anneau d'arsenic un peu plus grand pour la même quantité d'arsenic en employant l'acide chlorhydrique au lieu de l'acide sulfurique. Pour débarrasser l'hydrogène dégagé de l'eau entraînée The Conjoint Committee emploie du chlorure de calcium et non pas, comme moi, de l'acide sulfurique.

Ainsi en employant le sulfate de cuivre, l'addition de 5 gouttes de sulfate de cuivre normal donnait le meilleur résultat. Si on ajoutait une quantité moins grande, l'anneau d'arsenic était plus petit, et il fallait un temps relativement trop long avant que le dégagement d'hydrogène eût assez de vivacité pour qu'on pût allumer le bec de gaz, tandis qu'une quantité plus grande, telle que 1^{cc} ou au-delà, produisait un dégagement d'hydrogène trop vif, ce qui empêchait en partie la décomposition de l'hydrogène arsénié au tube chauffé au rouge.

2) Avec de l'acide chloroplatinique on avait le meilleur résultat en ajoutant 2 gouttes d'une solution de 5 p. c. d'acide chloroplatinique. Cette quantité donnait le plus beau dégagement d'hydrogène et le plus grand anneau d'arsenic. L'effet était presque tout-à-fait le même qu'avec 5 gouttes de sulfate de cuivre. Déjà en ajoutant 5 gouttes d'acide chloroplatinique, le dégagement d'hydrogène devenait trop vif, et l'anneau d'arsenic diminuait.

3) En se servant de zinc fondu avec de la poudre de fer, le dégagement d'hydrogène se faisait avec la même vivacité que pour 5 gouttes de sulfate de cuivre normal, mais l'anneau d'arsenic devenait moins grand. Si au zinc mélangé avec du fer on ajoutait 5 gouttes de sulfate de cuivre normal, l'anneau d'arsenic s'agrandissait, mais sans obtenir les dimensions obtenues par du zinc pur.

4) A ces essais on en ajouta un autre en se servant de zinc pur sans addition d'autres réactifs pour accélérer le dégagement d'hydrogène. Dans ce cas il fallait 2 heures avant que le dégagement d'hydrogène fût assez avancé pour qu'on pût allumer le bec de gaz. De plus, l'expérience durait 2 heures. Le résultat en était que l'anneau d'arsenic devenait moins grand que dans tous les autres essais. Il était plus petit même que l'anneau obtenu en se servant de zinc mélangé de fer et sans addition de sulfate de cuivre.

Ainsi l'assertion que quelques gouttes de sulfate de cuivre diminueraient l'anneau d'arsenic, par suite de la combinaison d'une partie de l'arsenic avec le cuivre, ne paraît pas absolument exacte dans le cas où il s'agit d'aussi petites quantités que 5 gouttes de sulfate de cuivre normal.

Dans ces dosages il était d'importance de renouveler l'acide sulfurique du flacon laveur à chaque essai. En effet, si on s'en servait pour des essais consécutifs, l'anneau que formait la même quantité d'arsenic allait en grandissant. La cause en était, sans doute, que l'acide sulfurique, plus dilué aux derniers essais, ne décomposait pas autant d'hydrogène arsénié qu'aux premiers. Il arrivait même que l'hydrogène arsénié absorbé aux essais antérieurs était rendu lorsque l'acide sulfurique se diluait.

Après avoir constaté ces faits, on pouvait passer à l'établissement

d'une échelle normale d'anneaux d'arsenic correspondant à des quantités connues d'arsenic. On établissait deux échelles en prenant de la solution d'anhydride arsénieux indiquée plus haut des quantités de 40, de 20, de 10, de 5, de 3.3, de 2, de 1, de $\frac{1}{2}$ cc correspondant respectivement à $\frac{2}{5}$, à $\frac{1}{5}$, à $\frac{1}{10}$, à $\frac{1}{20}$, à $\frac{1}{30}$, à $\frac{1}{50}$, à $\frac{1}{100}$, à $\frac{1}{200}$ milligramme d'arsenic. Dans l'une des séries on amena le dégagement d'hydrogène par 5 gouttes de sulfate de cuivre normal, dans l'autre on se servit dans ce but de 2 gouttes d'acide chloroplatinique. La comparaison des deux séries était à l'avantage du sulfate de cuivre, quoique la différence ne fût que minime. Aussi se servait-on de sulfate de cuivre à tous les essais postérieurs.

On conserva les tubes, dont le bout effilé était fermé à la cire d'Espagne, pour servir d'échelle normale aux essais postérieurs.

Ces séries ont montré qu'on pouvait distinguer nettement des quantités de $\frac{2}{5}$ mg à $\frac{1}{200}$ mg d'As avec les intermédiaires indiqués plus haut. Comme des essais faits dans des appareils différents avec des quantités égales d'arsenic donnaient des anneaux d'arsenic égaux, on est en droit de dire que la méthode sous cette forme, qui est presque identique aux règles établies par la Chemisk Forening de Copenhague en 1886, satisfait à toutes les exigences raisonnables relatives à la sensibilité, à l'exactitude, à l'exécution rapide et facile au dosage de petites quantités d'arsenic.

3. Méthodes d'oxydation.

La méthode de dosage au moyen de l'appareil de Marsh établie et, essayée ainsi que nous venons de le dire, permet la comparaison et le jugement des méthodes énumérées dans l'introduction et servant à séparer l'arsenic des matières organiques. De toutes les méthodes d'oxydation la méthode de M. H. Reddelien¹⁾, employant le permanganate de potassium et l'acide sulfurique concentré, est la plus rapide et la plus facile à appliquer.

On introduit la matière à examiner dans un ballon de 750 cc. On ajoute, si la matière pèse moins de 6 grammes, 20 cc d'eau et du permanganate de potassium solide d'une fois et demie le poids de la matière. On agite bien le mélange et, au bout de quelques minutes, on additionne 25 cc d'acide sulfurique concentré, qu'on fait descendre avec précaution le long des parois du ballon. Au bout de quelques minutes l'oxydation est achevée. On remplit d'eau jusqu'à environ 130 cc. On décolore avec un peu d'acide oxalique, ou on porte la matière directement à l'appareil de Marsh.

¹⁾ Loc. cit.

Ce procédé permet de se servir de 50^{cc} de bière de conserve pour faire le dosage de l'arsenic. Avec des quantités de bière plus grandes, le liquide oxydé devient d'un volume trop grand pour être introduit dans l'appareil de Marsh décrit ci-dessus. Pour achever l'oxydation de 50^{cc} de bière il faudra 12^{gr} de permanganate de potassium solide et 25^{cc} d'acide sulfurique concentré. Ayant achevé l'oxydation, on remplit jusqu'à 100^{cc} et décolore au moyen de 2—3 grammes d'acide oxalique solide, ce qui correspond à 1—1½ gramme de $KMnO_4$. Le liquide limpide comme de l'eau est examiné à l'appareil de Marsh.

Voici le résultat d'essais répétés :

Addition d'As	Anneau d'arsenic
Contrôle: 12 ^{gr} $KMnO_4$ + 25 ^{cc} H_2SO_4 + 9 ^{gr} d'acide oxalique	aucun
50 ^{cc} de bière	—
50 ^{cc} - — + $\frac{1}{100}$ mg d'As	—
50 ^{cc} - — + $\frac{1}{20}$ mg —	< $\frac{1}{200}$ mg d'As
25 ^{cc} - — + $\frac{1}{20}$ mg —	env. $\frac{1}{100}$ mg —

Il faut remarquer que souvent ces essais échouaient. En effet, le liquide oxydé contenant des quantités de sulfate de potassium et de sulfate manganoux tend, dans l'appareil de Marsh, à former de l'écume si le dégagement d'hydrogène est très vif, ce qui est le cas lorsque le contenu d'As du liquide atteint $\frac{1}{20}$ mg. Cette formation d'écume était tellement forte à quelques-uns des essais que le contenu débordant se rendait au flacon laveur et de là au tube d'essai chauffé au rouge. Le tube éclatait. L'essai était manqué.

Comme il est difficile de montrer $\frac{1}{20}$ mg d'arsenic en 50^{cc} de bière et que la réaction de $\frac{1}{20}$ mg d'arsenic en 25^{cc} de bière n'est que de $\frac{1}{100}$ mg d'arsenic, ou à peu près, cette méthode, malgré sa grande simplicité, n'est pas satisfaisante aux dosages d'arsenic dans la bière. Elle n'est pas suffisamment sensible. Dans de telles recherches il faut une sensibilité assez grande pour qu'on puisse indiquer avec certitude $\frac{1}{100}$ mg d'arsenic contenu en 100^{cc} de bière, ainsi que c'est le cas pour la méthode d'oxydation au moyen de l'acide nitrique (v. plus loin).

Ajoutons que le dosage d'arsenic en la bière ne peut pas se faire en introduisant la bière directement à l'appareil de Marsh. En effet, si on porte 50^{cc} de bière de conserve ou davantage à l'appareil directement, le contenu débordera en écumant. Si on évapore la bière jusqu'à la moitié de son volume, on pourra en introduire 75^{cc} sans débordement d'écume, mais le dégagement d'hydrogène s'arrêtera vite

sans reprendre, même après l'addition de 10^{cc} d'acide sulfurique concentré. A des essais où on avait ajouté $\frac{1}{20}$ ^{mg} d'arsenic à la bière, il ne se produisait au tube qu'une trace à peine visible de dépôt.

L'oxydation par l'acide sulfurique concentré d'après Kjeldahl¹⁾ ou par l'électrolyse dans un liquide fortement sulfaté d'après MM. Budde et Schou²⁾ demande un temps démesurément long s'il s'agit d'aussi grandes quantités que de 50 à 100^{cc} de bière. Elle demande aussi pas mal de surveillance, la matière tendant à déborder en écumant.

L'oxydation par le chlorate de potassium et l'acide chlorhydrique, recommandée par beaucoup de chimistes, ne convient pas à ces essais, auxquels il s'agissait de quantités d'arsenic très petites, l'acide chlorhydrique du commerce, soi-disant exempt d'arsenic, contenant des quantités notables d'arsenic dans le volume d'acide qu'il faut employer. Pour se servir de l'acide chlorhydrique, il faudrait donc produire soi-même l'acide nécessaire aux analyses, mais ceci demanderait, pour des recherches étendues sur la bière, un travail assez considérable.

Il nous reste à parler de l'oxydation en fondant avec du salpêtre et de l'oxydation par l'acide nitrique et l'acide sulfurique concentrés.

Je ne me suis servi que de la dernière de ces deux méthodes. Vis-à-vis de la première, celle-ci offre le grand avantage de ne pas faire entrer de grandes quantités de substances non volatiles qui, plus tard, lors de l'évaporation de l'acide nitrique avec l'acide sulfurique, occasionneraient des soubresauts violents. De plus, l'acide nitrique du commerce se montrait toujours exempt d'arsenic. La méthode était donc à priori tout indiquée pour ces recherches.

L'application de l'acide nitrique et de l'acide sulfurique concentrés à l'oxydation de matières organiques aux recherches de l'arsenic a été proposée par M. Gautier³⁾. L'oxydation au moyen de ces acides laisse une masse carbonisée qu'on épuise par de l'eau. La solution réduite par le bisulfite de sodium est ensuite précipitée par l'hydrogène sulfuré, et le sulfure d'arsenic est transformé en acide arsénique, qu'on introduit dans l'appareil de Marsh. MM. R. H. Chittenden et H. Donaldson⁴⁾ recommandent la méthode de Gautier avec l'emploi de l'appareil de Marsh. Ils font observer que c'est la méthode qui de-

¹⁾ Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg II, 1 (1883).
Zeitschr. f. anal. Chem. XXII, 366 (1883).

²⁾ Zeitschr. f. anal. Chem. XXXVIII, 344 (1899).

³⁾ Bull. Soc. chim. XXIV, 250 (1875).

⁴⁾ Ref. Zeitschr. f. anal. Chem. XXI, 478 (1882).

mande le moins de réactifs possible: du zinc, de l'acide sulfurique et de l'acide nitrique. Dernièrement la méthode, quelque peu modifiée, a été employée en Angleterre par MM. W. Thomson et J. P. Shenton¹⁾ aux recherches d'arsenic dans les bières.

Des essais faits avec de la bière de conserve, additionnée d'arsenic, d'après la méthode de MM. Thomson et Shenton, ont donné les résultats que voici:

Essais	Anneau d'arsenic
Contrôle: 45^{cc} HNO^3 + 5^{cc} H^2SO^4	aucun
50^{cc} de bière	—
50^{cc} - — + $\frac{1}{100}^{\text{mg}}$ d'arsenic	environ $\frac{1}{100}^{\text{mg}}$ d'arsenic
50^{cc} - — + $\frac{1}{20}^{\text{mg}}$ —	{ moins de $\frac{1}{50}^{\text{mg}}$ —
	{ égal à $\frac{1}{20}^{\text{mg}}$ —

Ainsi l'erreur dont était entachée la méthode entre mes mains était que, dans un cas, sur $\frac{1}{20}^{\text{mg}}$ d'arsenic en 50^{cc} de bière je ne pouvais montrer que $\frac{1}{80}^{\text{mg}}$, et que, dans un autre cas, je n'en trouvais même que moins de $\frac{1}{50}^{\text{mg}}$. Cependant, par un examen plus approfondi on voyait que ces résultats variés étaient dus surtout à deux causes: d'abord les composés oxygénés de l'azote formés par l'oxydation au moyen de l'acide nitrique n'étaient pas toujours complètement chassés; puis, la matière organique n'était pas absolument détruite avant l'essai à l'appareil de Marsh.

Par l'oxydation au moyen de l'acide nitrique il se forme, surtout vers la fin de l'opération où le liquide contient de l'acide sulfurique bouillant presque concentré, du sulfate acide de nitrosyle $\text{SO}^2 \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \text{O.NO} \end{smallmatrix}$ (cristaux des chambres de plomb). En évaporant la solution jusqu'à ce qu'elle commence à émettre des vapeurs sulfuriques, tout l'acide azotique est chassé, tandis que le sulfate acide de nitrosyle reste dans la fiole, formant un liquide qui est jaune ou jaune vert à la chaleur, mais qui se décolore au froid. Quand on étend d'eau ce liquide jusqu'à la densité de 1.2 (30 p. c. de H^2SO^4), il se décompose. Évaporé jusqu'à la formation de vapeurs sulfuriques il perd tous les composés oxygénés de l'azote (A. Rose²⁾). MM. Thomson et Shenton proposent de porter le liquide à deux fois son volume en l'étendant d'eau,

¹⁾ Loc. cit.

²⁾ Pogg. Ann. L 161 (1840).

puis d'évaporer jusqu'à la formation de vapeurs sulfuriques. A mes essais ce procédé ne donnait pas toujours un résultat satisfaisant. Mais en répétant les dilutions et les évaporations deux ou trois fois on arrivait toujours à chasser tous les composés oxygénés de l'azote. La nécessité de cette mesure fait que l'analyse demande un temps plus long. Aussi fut-ce un perfectionnement essentiel de la méthode que l'application du procédé de Pelouze¹⁾ pour l'élimination des composés oxygénés de l'azote de l'acide sulfurique. Suivant ce procédé on chauffe à 160° avec du sulfate d'ammonium. En remplaçant les évaporations répétées par ce procédé on obtenait d'excellents résultats. Sous l'influence des composés oxygénés de l'azote et de l'acide azotique le sulfate d'ammonium y donne de l'azote et de l'eau. C'est cette réaction, on sait, qui empêche l'application de la méthode du dosage de l'azote de Kjeldahl²⁾ aux composés contenant de l'acide azotique ou du bioxyde d'azote, avant qu'on ait traité ces composés par un corps réducteur.

Plusieurs essais ont montré qu'il est nécessaire qu'après la décomposition du sulfate acide de nitrosyle et sa dilution d'eau le liquide soit absolument incolore, en d'autres mots: que toute matière organique soit détruite. En effet, si la solution est tant soit peu jaunâtre, l'anneau d'arsenic diminue toujours sensiblement. Cependant, comme le plus souvent après l'oxydation au moyen de l'acide nitrique le liquide chaud était d'une teinte jaune due au sulfate acide de nitrosyle qu'il contenait, j'ai préféré d'ajouter au liquide chaud encore quelque 2^{cc} d'acide nitrique concentré pour m'assurer de la destruction complète de toute matière organique, ce qui a fait diminuer sensiblement la teinte jaune s'il y restait encore de la matière organique. En évaporant et en traitant après avec du sulfate d'ammonium j'ai toujours obtenu un liquide absolument incolore³⁾.

¹⁾ Ann. chem. phys. [3], II, 47 (1841).

²⁾ Loc. cit.

³⁾ Après que j'eus écrit ceci, on a donné, à la Chemiker Zeitung n° 47, 1902, le compte-rendu d'une séance tenue à Leeds le 26 mai 1902 par la Society of Chemical Industry, section d'Yorkshire, à laquelle M. A. J. Murphy a attiré l'attention sur le même fait: la nécessité de la destruction complète, par oxydation, des matières organiques, avant le dosage à l'appareil de Marsh, pour arriver à des résultats s'accordant entre eux et qu'autrement on n'obtiendra pas. Au même endroit M. W. Ackroyd déconseille l'emploi d'anneaux d'arsenic comme „standards“ croyant avoir remarqué qu'ils se présentent avec des couleurs variées d'après la vivacité du dégagement d'hydrogène. D'après ce que je viens de dire plus haut, cette objection n'est bien fondée qu'au cas où on néglige les précautions déjà indiquées en se servant de l'appareil de Marsh. Si on les observe, le dégagement d'hydrogène se fera toujours avec la même vivacité pour la même teneur en arsenic.

Après avoir constaté que cette méthode d'oxydation peut servir avec utilité, j'ai passé à des expériences pour reconnaître l'influence que pourra exercer la variation des manipulations.

J'ai commencé par déterminer les quantités d'acide azotique nécessaires à l'oxydation de 100^{cc} de bière selon que l'oxydation avait lieu dans une fiole de 200^{cc} ou dans une capsule de porcelaine découverte, et selon que les volumes d'acide azotique additionnés à la fois étaient plus au moins grands. En même temps on a observé le temps nécessaire aux différentes oxydations.

A toutes les expériences on commençait l'oxydation par 20^{cc} d'acide azotique et 5^{cc} d'acide sulfurique. Voici les volumes d'acide azotique supplémentaires qu'il a fallu ajouter pour obtenir l'oxydation complète :

Expériences	Acide azotique additionné	Quantité d'acide azotique employé en ^{cc}	Durée de l'oxydation en heures
Dans une fiole de 200 ^{cc}	en une fois	25	2½
— — —	par 2 ^{cc}	15	2
Dans une capsule de porcelaine..	25 + 25 + 10 + 10		
	+ 5 + 5 + 5 ^{cc}	85	2¾
— — — ..	par 2 ^{cc}	50	1½

On voit donc que l'oxydation dans une capsule de porcelaine demandait beaucoup plus d'acide azotique que dans une fiole, et comme la durée des expériences ne variait pas beaucoup, il faut aux dosages préférer l'oxydation dans une fiole¹⁾.

On voit encore de ces expériences que l'oxydation s'opère au moyen de quantités d'acide azotique moins grandes quand on ajoute l'acide par de petites doses de 2^{cc} que lorsqu'on l'additionne par des quantités plus grandes de 25^{cc}. Mais l'addition par de petites doses étant un travail pénible et désagréable lorsqu'il s'agit de beaucoup d'analyses simultanées, je préférerais d'ajouter l'acide en grandes parties en commençant par 30^{cc} et en descendant, vers la fin de l'oxydation, à des quantités de 10 à 2^{cc}.

Avant l'oxydation il fallait évaporer les 100^{cc} de bière de chaque expérience. Des expériences ont montré que l'oxydation s'opère le plus tranquillement si on évapore à la moitié du volume. Rien n'em-

¹⁾ Quoique tout verre contienne de l'arsenic, il ne m'était jamais possible d'en constater l'introduction dans l'analyse en employant des fioles d'Iéna à l'oxydation au moyen de l'acide azotique.

pêche de faire évaporer dans une capsule de porcelaine, mais en se servant de la fiole dans laquelle l'oxydation aura lieu plus tard, on économisera naturellement du travail. L'inconvénient en est, cependant, qu'avant l'ébullition de la bière il se forme une forte écume qui souvent sort du col en débordant et qu'il n'est pas facile de réprimer.

On prévient cette formation d'écume par l'addition d'acide tannique ou, mieux encore, d'acide azotique: 15 à 20 gouttes d'acide azotique concentré par 100^{cc} de bière donnaient le meilleur résultat. Par l'addition de cette quantité la bière entre en ébullition sans la moindre formation d'écume, s'évaporant par l'ébullition dans les fioles obliquement posées aussi vite qu'en capsule de porcelaine. Quand on ajoute une quantité plus forte d'acide azotique, 5^{cc} par exemple, la bière entre en ébullition sans formation d'écume, mais, évaporée à la moitié environ de son volume, elle a souvent une tendance à faire explosion en lançant tout le contenu par le col. Au contraire, une quantité moins grande que 15 gouttes d'acide azotique ne suffit pas toujours à prévenir la formation de l'écume.

Après l'addition de 15 à 20 gouttes d'acide azotique la bière est évaporée au volume de 60—50^{cc}. Si on mène plus loin l'évaporation, l'oxydation commencera souvent, après qu'on aura ajouté de l'acide azotique et de l'acide sulfurique, avec une violence tellement grande que le refroidissement instantané de la fiole sera nécessaire pour empêcher le débordement du contenu.

Après quelques essais d'orientation j'ai préféré d'employer pour l'oxydation même 30^{cc} d'acide azotique concentré et 10^{cc} d'acide sulfurique concentré. Quand on emploie moins de 30^{cc} d'acide azotique — soit, par exemple, 10^{cc} —, l'oxydation ne se passe pas sans agitation.

Voici les résultats de recherches faites d'après la méthode de l'acide azotique sous cette forme:

Essais	Anneau d'arsenic
Contrôle: 45 ^{cc} HNO ³ + 10 ^{cc} H ² SO ⁴ + (NH ⁴) ² SO ⁴ ..	aucun
100 ^{cc} de bière de conserve	—
100 ^{cc} - - - + 1/100 ^{mg} d'arsenic.....	= 1/100 ^{mg} d'arsenic
100 ^{cc} - - - + 1/20 ^{mg} -	≤ 1/20 ^{mg} —
100 ^{cc} - - - + 1/10 ^{mg} -	≤ 1/10 ^{mg} —
100 ^{cc} - - - + 1/5 ^{mg} -	≤ 1/5 ^{mg} —

Comme, dans ces essais, l'arsenic, après l'oxydation au moyen de l'acide azotique, se présente sous la forme d'acide arsénique, j'ajouterai que des essais directs ont montré que l'arsenic sous cette forme donne

exactement le même anneau que la même quantité d'arsenic sous la forme d'acide arsénieux.

Ainsi donc, quand même les anneaux d'arsenic, obtenus par cette forme de la méthode de l'acide azotique, n'étaient pas tout aussi grands que ceux de l'échelle normale, ils en étaient assez près pour exclure tout jugement erroné, qu'il s'agisse de petites ou de plus grandes quantités d'arsenic. Comme d'ailleurs ce procédé dépasse en exactitude toutes les autres méthodes essayées par moi, ce fut elle que nous avons choisie pour la recherche définitive d'arsenic dans les bières danoises (Résultats v. p. 131).

Voici, en résumé, la manière de procéder en se servant de la méthode de l'acide azotique:

On débarrasse la bière de l'excès d'acide carbonique en agitant dans un grand flacon à large ouverture bouché à l'éméri. On la verse sur un filtre plissé qui retient l'écume formée par l'agitation. Pour chaque dosage on enlève avec une pipette 100^{cc} de bière, qu'on met dans une fiole d'Iéna de 200^{cc} de capacité; puis on ajoute 15 gouttes d'acide azotique concentré. La fiole est inclinée sur un bec d'Argand (pourvu d'une cheminée de terre), comme pour les dosages d'azote de Kjeldahl. On évapore pendant une heure jusqu'à 60^{cc}. Après le refroidissement, la bière est prête à être oxydée. On ajoute 30^{cc} d'acide azotique concentré et 10^{cc} d'acide sulfurique concentré. En laissant reposer, l'oxydation commencera toute seule au bout de quelque temps; cependant, on fera bien de l'accélérer en chauffant doucement et avec précaution. A l'ordinaire, l'oxydation commence d'un coup et avec violence, accompagnée de vapeurs nitreuses. Aussi faut-il éteindre la flamme aussitôt après la production de cette réaction. On rallume le bec au bout de quinze minutes. Après quelque temps d'ébullition le contenu de la fiole commence à s'assombrir. On ajoute encore 30^{cc} d'acide azotique. On continue d'additionner ainsi des quantités convenables d'acide azotique jusqu'à ce que le liquide cesse de se brunir quand on évapore jusqu'à l'apparition de vapeurs sulfuriques. Ainsi que nous avons dit plus haut, on ajoute encore, pour plus de sûreté, quelques centimètres cubes d'acide azotique et, au bout d'un quart d'heure, trois ou quatre spatules — environ 0.^{gr}5 en tout — de sulfate d'ammonium solide. Après trois quarts d'heure d'ébullition l'opération est finie: la solution est prête à être essayée à l'appareil de Marsh. La sensibilité est de 1 : 10,000,000, c'est à dire: on pourra constater la présence de $\frac{1}{100}$ mg d'arsenic en 100^{cc} de bière¹⁾.

¹⁾ Voici, au contraire, la méthode des recherches d'arsenic dans les bières recommandée par The Conjoint Committee: dans un creuset de

Denigès¹⁾ propose d'employer à l'oxydation des matières organiques de l'acide azotique et une solution contenant 2 p. c. de permanganate de potassium. Cependant, un essai, fait ainsi, ne paraissait présenter aucun avantage ni pour l'économie de la durée de l'opération ni pour l'économie de l'acide.

Voici un autre essai de l'emploi d'acide azotique et de permanganate de potassium: comme à l'ordinaire la bière évaporée est oxydée au moyen de 30^{cc} d'acide azotique et de 10^{cc} d'acide sulfurique jusqu'à la coloration sombre. On achève l'oxydation en ajoutant du permanganate de potassium solide, puis on décolore au moyen d'acide oxalique (2^{gr}). L'oxydation faite ainsi demande beaucoup moins de temps que si on emploie l'acide azotique seul, et on n'emploie que 6^{gr} de permanganate de potassium contre 24^{gr} que demande la méthode de M. H. Reddelien. Mais à l'évaporation jusqu'à la production de vapeurs sulfuriques pour chasser l'acide azotique il s'est produit des soubresauts tellement violents par suite des sulfates que contient le liquide, qu'il a fallu cesser l'opération.

4. Méthode de précipitation d'après Reinsch.

Nous avons dit que cette méthode a été élaborée surtout en Angleterre pour servir aux recherches des bières par MM. A. Chapman, Alf. H. Allen, E. Jones, The Commission to the Manchester Brewers' Central Association²⁾. Tous ils font bouillir la bière avec du cuivre poli. Ils caractérisent le dépôt de cuivre soit en chauffant le cuivre dans un tube étroit fermé d'un bout (Chapman, Allen, Commission), soit en faisant dissoudre le dépôt d'arsenic pour le doser en précipitant par l'hydrogène sulfuré et en pesant (E. Jones).

De ces méthodes, la première n'est qu'une épreuve qualitative d'arsenic. On en indique la sensibilité à 1 : 2,000,000 soit 1/10^{mg} d'arsenic en 200^{cc}. En faisant un essai avec cette quantité j'ai obtenu un dépôt distinct noir, dont j'ai essayé la caractérisation en sublimant dans un tube étroit suivant les indications de la Commission

porcelaine on chauffe 10^{gr} de la matière sur un bain de sable avec 10—15^{cc} d'acide azotique jusqu'à la cessation des vapeurs rutilantes d'acide hypoazotique. On ajoute 3^{cc} d'acide sulfurique concentré en chauffant jusqu'au commencement de la carbonisation. Cela fait, on additionne encore 5^{cc} d'acide azotique. On continue de chauffer pour chasser tout l'acide. On épuise le résidu noir et carbonisé avec de l'acide chlorhydrique étendu, et lave à l'eau. Le filtré, qui doit être parfaitement incolore, est évaporé à 30^{cc} et examiné à l'appareil de Marsh.

¹⁾ Ref. Chem. Centr. Blatt, LXXII, 2 P. 956 (1901).

²⁾ Loc. cit.

sans réussir à obtenir un sublimé de cristaux d'anhydride arsénieux reconnaissable sous le microscope.

Au contraire, le procédé de Reinsch a été employé par M. E. Jones¹⁾ pour doser l'arsenic dans la bière. Il fait bouillir celle-ci avec de l'acide chlorhydrique et deux rouleaux, l'un après l'autre, de toile métallique de cuivre, en maintenant l'ébullition avec un rouleau pendant une heure et après avec l'autre pendant une demi-heure. On dissout le dépôt d'arsenic en traitant les rouleaux de cuivre avec 5^{cc} d'une solution normale d'hydrate de sodium et 3—4 gouttes d'une solution contenant 10 p. c. de bioxyde d'hydrogène. L'arsenic est précipité de la solution au moyen d'hydrogène sulfuré et pesé sous la forme de trisulfure d'arsenic.

Cependant, ce serait un grand avantage si, au lieu de doser l'arsenic sous la forme de trisulfure d'arsenic et de peser ce dernier, on pouvait doser la solution du dépôt d'arsenic dans la solution alcaline de bioxyde d'hydrogène directement à l'appareil de Marsh. On a fait quelques essais dans ce but. Il s'en suivait que cela pourrait se faire avec un résultat assez satisfaisant si la solution à examiner était exempte de matière organique, mais pas autrement.

1) En effet, si pendant une heure on faisait bouillir avec 25^{cc} d'acide chlorhydrique concentré et un rouleau de cuivre 200^{cc} de bière, évaporée à la moitié de son volume, + $\frac{1}{20}$ mg d'arsenic, la solution d'un ton brun noir, obtenue en traitant le rouleau de cuivre avec une solution d'hydrate de sodium et de bioxyde d'hydrogène, ne donnait, à l'essai direct à l'appareil de Marsh, qu'un anneau d'arsenic égal à environ $\frac{1}{100}$ mg d'arsenic.

2) Si, au contraire, on faisait bouillir avec de l'acide chlorhydrique et un rouleau de cuivre 100^{cc} d'eau + $\frac{1}{20}$ mg d'arsenic on obtenait, après le traitement avec l'hydrate de sodium et le bioxyde d'hydrogène, un liquide limpide comme de l'eau et qui donnait un anneau d'arsenic égal à $\frac{1}{20}$ mg d'arsenic.

3) De même, 100^{cc} d'eau bouillant, sans addition d'arsenic, pendant une heure avec 25^{cc} d'acide chlorhydrique et un rouleau de cuivre, donnaient, après le traitement avec l'hydrate de sodium et le bioxyde d'hydrogène, une solution qui, essayée à l'appareil de Marsh, donnait un anneau d'arsenic égal à $\frac{1}{100}$ mg d'arsenic.

4) En dosant l'arsenic de 50^{cc} d'acide chlorhydrique, en l'évaporant avec de l'eau (50^{cc}) et de l'acide azotique (20^{cc}) et de l'acide sulfurique (10^{cc}) jusqu'à l'émission de vapeurs sulfuriques, puis faisant bouillir avec du sulfate d'ammonium, on obtenait un anneau d'arsenic égal à $\frac{1}{100}$ mg

¹⁾ Loc. cit.

d'arsenic. Donc 25^{cc} d'acide chlorhydrique contenaient $\frac{1}{200}$ mg d'arsenic. Il s'ensuit que la moitié du contenu d'arsenic de 3) provient du rouleau de cuivre et de l'hydrate de sodium et du bioxyde d'hydrogène. Ce résultat s'accorde avec le fait

5) qu'en traitant le rouleau de cuivre de la manière indiquée avec une solution alcaline de bioxyde d'hydrogène on obtenait un anneau égal à $\frac{1}{200}$ mg d'arsenic.

Pour essayer si, dans l'essai 1), la précipitation était complète ou non, on a oxydé la solution brune noire jusqu'au point où elle était limpide comme de l'eau. En effet, il était naturel de supposer que c'étaient les matières organiques de la solution colorée qui avaient empêché le dosage de l'arsenic dans l'appareil de Marsh. Il était facile d'obtenir l'oxydation et la décoloration de la solution brune noire en additionnant à la solution chaude du permanganate de potassium solide et de l'acide sulfurique et en décolorant avec des cristaux d'acide oxalique. On obtenait ainsi un liquide absolument limpide comme de l'eau. A l'essai de l'appareil de Marsh il donnait un anneau d'arsenic égal à $\frac{1}{80}$ mg d'arsenic si on avait mis à l'essai 200^{cc} de bière additionnée de $\frac{1}{20}$ mg d'arsenic.

Le tableau suivant donne les résultats d'essais, faits de cette manière, de bières contenant une quantité connue d'anhydride arsénieux.

Essais	Anneau d'arsenic	Trouvé
Contrôle: 2 rouleaux de cuivre bouillis avec 100 ^{cc} d'eau + 25 ^{cc} d'acide chlorhydrique	$\leq \frac{1}{80}$ mg d'arsenic	—
200 ^{cc} de bière	$> \frac{1}{100}$ mg —	rien
200 ^{cc} - — + $\frac{1}{80}$ mg d'arsenic....	$= \frac{1}{80}$ mg —	$\frac{1}{80}$ mg d'arsenic
200 ^{cc} - — + $\frac{1}{10}$ mg —	$= \text{env. } \frac{1}{10}$ mg —	$\frac{1}{10}$ mg —
200 ^{cc} - — + $\frac{2}{5}$ mg —	$= \frac{2}{5}$ mg —	$\frac{2}{5}$ mg —

D'après ceci la méthode paraissait assez satisfaisante et bien faite pour servir à des dosages de contrôle à côté de la méthode d'oxydation au moyen de l'acide azotique. Cependant, à cause de l'arsenic contenu dans l'acide chlorhydrique — l'essai de contrôle donnant $\frac{1}{80}$ mg d'arsenic — elle ne convient pas, nous venons de le dire, au dosage exact de quantités au-dessous de $\frac{1}{80}$ mg d'arsenic.

Restait encore à essayer l'indication de M. A. Allen¹⁾ suivant

¹⁾ The Analyst XXVI, 10 (1901).

laquelle l'arsenic qu'on trouve sous la forme d'acide arsénique doit être réduit à l'acide arsénieux avant la précipitation d'après Reinsch. On y arrive facilement en faisant bouillir avec une solution chlorhydratée de chlorure cuivreux. Voici les résultats obtenus en essayant de la bière avec et sans chlorure cuivreux, après qu'on l'eut additionnée d'acide arsénique et fait bouillir avec une toile métallique de cuivre poli:

Essais	Faisant bouillir	Anneau d'arsenic	Arsenic trouvé
Contrôle: 25 ^{cc} H Cl + 10 ^{cc} d'une solution contenant 10 p. c. de Cu ² Cl ²	avec du Cu ² Cl ²	1/100 mg	—
200 ^{cc} de bière + 1/50 mg As (As ² O ⁵)....	— —	1/50 mg	1/50 mg
200 ^{cc} - - + 1/50 mg —	sans —	1/50 mg	1/50 mg
200 ^{cc} - - + 2/5 mg —	avec —	2/5 mg	2/5 mg
200 ^{cc} - - + 2/5 mg —	sans —	≥ 1/5 mg	≥ 1/5 mg

Ainsi il ne faut pas laisser d'ajouter du chlorure cuivreux en présence de quantités considérables d'acide arsénique. Au contraire, pour des quantités peu importantes comme 1/50 mg on peut s'en passer.

Voici donc quel sera le procédé à suivre pour la recherche d'arsenic dans les bières d'après la méthode de Reinsch ainsi modifiée et jointe à l'appareil de Marsh.

On évapore 200^{cc} de bière jusqu'à la moitié de son volume dans une fiole inclinée de 300^{cc} de capacité. On fait bouillir pendant une heure après avoir ajouté 25^{cc} d'acide chlorhydrique concentré pur, 10^{cc} d'une solution chlorhydratée contenant 10 p. c. de chlorure cuivreux et un rouleau de toile métallique de cuivre poli (2 1/2 × 9 cm). On enlève le rouleau qu'on remplace par un deuxième rouleau, avec lequel on fait bouillir pendant une demi-heure. On lave avec précaution les deux rouleaux à l'eau; puis on chauffe dans une éprouvette avec 5^{cc} d'une solution normale d'hydrate de sodium et 5 gouttes d'une solution contenant 10 p. c. de bioxyde d'hydrogène. On verse la solution du dépôt d'arsenic et l'eau de lavage des rouleaux de cuivre — en tout environ 75^{cc} — dans une fiole de 300^{cc} de capacité. On y ajoute du permanganate de potassium solide et 5^{cc} d'acide sulfurique concentré. Puis on chauffe, et on décolore au moyen de cristaux d'acide oxalique. Le liquide limpide comme de l'eau qu'il faut obtenir, sert directement au dosage à l'appareil de Marsh¹⁾.

¹⁾ On peut nettoyer les rouleaux de cuivre employés pour s'en servir à de nouveaux essais en les traitant avec de l'acide azotique dilué. L'acide

Néanmoins lorsque, plus tard, on faisait une longue série de recherches sur les bières en se servant tantôt de cette méthode, tantôt de la méthode de l'acide azotique, on constatait que la méthode de Reinsch n'était pas toujours absolument sûre: à quelques-unes des essais la précipitation de l'arsenic n'était pas complète. La cause en était-elle une petite différence à la préparation des rouleaux de cuivre ou bien une différence à la force de l'ébullition, c'est ce qui reste incertain. Mais comme l'économie de durée qu'on pourrait gagner peut-être en se servant de cette méthode plutôt que de l'oxydation au moyen de l'acide azotique n'était que peu importante, cette dernière méthode était absolument préférable à cause de sa sûreté.

5. Méthode de distillation.

Cette méthode, indiquée par MM. Schneider et Fyfe¹⁾ et modifiée plus tard par M. E. Fischer²⁾, trouve, ainsi que nous l'avons dit plus haut, une application étendue aux recherches d'arsenic. Nous avons fait les essais suivants pour en éprouver l'utilité au dosage de petites quantités d'arsenic dans les bières:

On évapore 200^{cc} de bière dans une capsule de porcelaine. On y ajoute 50^{cc} d'acide chlorhydrique et 20^{cc} d'une solution saturée de chlorure ferreux. On porte ce liquide dans un matras pour la distillation fractionnée de 500^{cc} de capacité pourvu d'un bouchon de liège. Le volume total du liquide sera ainsi de 150^{cc} à peu près. On en distille 100^{cc} qu'on évapore dans une capsule de porcelaine additionnant 20^{cc} d'acide azotique et 5^{cc} d'acide sulfurique pour chasser l'acide chlorhydrique. On évapore jusqu'à la production de vapeurs sulfuriques; puis on fait bouillir avec du sulfate d'ammonium. On porte la solution à l'appareil de Marsh pour l'y doser.

Essais	Anneau d'arsenic	Arsenic trouvé
Contrôle: 50 ^{cc} de H Cl + 20 ^{cc} de Fe Cl ³ en solution	= 1/100 mg	—
200 ^{cc} de bière.....	= 1/100 mg	rien
200 ^{cc} - — + 1/50 mg d'arsenic	= 1/50 mg	1/50 mg
200 ^{cc} - — + 1/10 mg —	≥ 1/50 mg	≥ 1/50 mg
200 ^{cc} - — + 1/5 mg —	≥ 1/5 mg	≥ 1/5 mg

détache le dépôt brun produisant une surface parfaitement polie. On rince à l'eau et conserve les rouleaux dans de l'eau faiblement chlorhydraté.

¹⁾ Loc. cit.

²⁾ Loc. cit.

Ainsi donc, pour de petites quantités d'arsenic on retrouve tout l'arsenic additionné, tandis que pour des quantités assez considérables — $\frac{1}{10}$ — $\frac{2}{5}$ mg d'arsenic —, on ne retrouvait, par une seule distillation, que la moitié, à peu près, de la quantité d'arsenic présente. Cette méthode n'égale donc pas non plus, pour l'exactitude, la méthode d'oxydation au moyen de l'acide azotique.

Je crois avoir compris, dans ce qui précède, toutes les méthodes de dosage de petites quantités d'arsenic desquelles il peut être question dans ces recherches. En voici le résultat :

1° *L'appareil de Marsh sous la forme décrite pp. 112—116 avec l'emploi de zinc et d'acide sulfurique purs convient parfaitement au dosage de petites quantités d'arsenic, pourvu que celui-ci ne se trouve pas combiné avec des matières organiques ou des sels en quantité démesurément grande.*

2° *L'acide sulfurique concentré est le meilleur moyen de dessiccation de l'hydrogène arsénié, pourvu qu'à chaque essai on emploie la même quantité de nouvel acide sulfurique.*

3° *Le tube d'essai doit être maintenu au rouge sombre.*

4° *Des différentes méthodes essayées pour donner à l'arsenic la forme convenable à son dosage au moyen de l'appareil de Marsh la plus sûre et la plus exacte c'est l'oxydation au moyen d'acide azotique et d'acide sulfurique, exécutée de la manière décrite plus haut (p. 124) avec l'emploi du sulfate d'ammonium pour chasser les composés oxygénés de l'azote.*

Nous finirons en donnant au tableau suivant les résultats d'une série de recherches sur les bières de Copenhague à fermentation basse et à fermentation haute, ainsi que de quelques bières anglaises. La méthode de dosage employée est la méthode de l'acide azotique.

Pour chaque essai on a employé 100^{cc} de bière. A la deuxième colonne du tableau on trouvera la quantité d'acide azotique consumée à l'oxydation complète de chaque échantillon. La troisième colonne montre la grandeur de l'anneau d'arsenic directement trouvé. La dernière colonne indique la teneur en arsenic des échantillons examinés, obtenue en déduisant la teneur en arsenic de l'essai de contrôle de l'arsenic trouvé directement. Dans les cas où la quantité indiquée par l'anneau d'arsenic n'atteignait pas $\frac{1}{200}$ mg d'As la teneur de l'échantillon examiné a été mise égale à zéro. En effet, il est impossible d'ar-

river à un dosage sûr de quantités d'arsenic tellement petites au moyen de l'appareil de Marsh sous la forme décrite ici; puis, ainsi qu'il résulte de la troisième colonne du tableau, la méthode d'oxydation ne permet pas de constater avec exactitude des quantités au-dessous de $\frac{1}{200}$ mg d'As. Par conséquent, la sensibilité de la méthode est évaluée à $\frac{1}{100}$ mg d'As en 100^{cc} de bière.

Marque de la bière	Quantité d'acide azotique consommé	Anneau d'arsenic	Arsenic trouvé
	en centimètres cubes	mg. d'As	mg. d'As
Bières à fermentation basse:			
Contrôle: 10 ^{cc} de H ² SO ⁴ + (NH ⁴) ² SO ⁴	75	< $\frac{1}{200}$	aucun
Gl. Carlsberg: Imperial Stout	30 + 30 + 30 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
ibid. Export Beer	30 + 30 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
ibid. Bière de conserve	30 + 30 + 15	0	—
ibid. Bière de Pilsner	30 + 30 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
Ny Carlsberg: Double Brown Stout...	30 + 30 + 30 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
ibid. Export Beer	30 + 30 + 15 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
ibid. Bière de conserve	30 + 30 + 15 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
ibid. Bière de Pilsner	30 + 30	< $\frac{1}{200}$	—
Tuborgs Fabrikker: Bière de conserve	30 + 30 + 15 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
ibid. Bière de Pilsner..	30 + 30	< $\frac{1}{200}$	—
De forenede Bryggerier: Alliance Double Brown Stout	30 + 30 + 30 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
Bières à fermentation haute:			
De forenede Bryggerier: Vrai extrait de malt	30 + 30 + 30 + 15 + 15 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
ibid. Vraie bière à couronne...	30 + 30 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
ibid. Pilsner à couronne	30 + 30 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
ibid. Bière centrale prem. qual.	30 + 30 + 15	0	—
ibid. Bière blanche centrale no. 1	30 + 30 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
ibid. Bière de mer centrale no. 1	30 + 30 + 15	0	—
Kbh. Bryg. og Malterier: Bière à couronne	30 + 30 + 15 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
ibid. Pilsner à fermentation haute	30 + 30 + 15	0	—
ibid. Bière blanche prem. qual.	30 + 30 + 15	< $\frac{1}{200}$	—
ibid. Bière blanche no. 1	30 + 30 + 15	0	—
ibid. Bière de mer no. 1	30 + 30	< $\frac{1}{200}$	—
Bières anglaises:			
Bass & Co: Imperial Stout (B 771)....	30 + 30 + 30 + 15 + 15	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$
ibid. Pale Ale	30 + 30 + 15	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$
Guinness: Extra Stout	30 + 30 + 30 + 15	> $\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
Whitbread & Co: Stout	30 + 30 + 30	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$

Il résulte de ces analyses que des bières de toutes les brasseries de Copenhague — qu'il s'agisse de bières à fermentation basse, de bières à fermentation haute, ou même des bières les plus riches en extrait de malt — pas une ne contenait la moindre trace d'arsenic. Au contraire, on en constatait une trace minime et sans importance dans les bières de plusieurs des brasseries anglaises les plus importantes. Ce fait tient peut-être à la construction particulière des tourailleries anglaises.

Juillet 1902.



TABLE DES MATIÈRES.

	Page
Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques.	
Par Emil Chr. Hansen.....	64
XI. La spore de <i>Saccharomyces</i> devenue sporange. (Avec 2 figures dans le texte).....	64
XII. Recherches comparatives sur les conditions de la croissance végétative et le développement des organes de reproduction des levures et des moisissures de la fermentation alcoolique. (Avec 4 figures dans le texte).....	68
1. <i>Saccharomyces</i>	68
Aperçu de mes recherches antérieures.....	68
Recherches nouvelles.....	74
Le bourgeonnement, p. 74. La formation de spores, p. 78. Sur les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation, p. 85	
2. Levures alcooliques aux cellules ressemblant aux <i>Saccharomyces</i>	92
3. <i>Oïdium lactis</i>	95
4. <i>Mucor</i>	95
Dosage de petites quantités d'arsenic dans les matières organiques, spécialement dans la bière et dans le moût. Par Carl Pedersen.....	108
1. Introduction.....	108
2. L'appareil de Marsh.....	111
3. Méthodes d'oxydation.....	117
4. Méthode de précipitation d'après Reinsch.....	125
5. Méthode de distillation.....	129

FEB 8 1926

Carlsberg Laboratoriet. Copenhagen.

COMPTE-RENDU

DES TRAVAUX

DU

LABORATOIRE DE CARLSBERG.

5^{ME} VOLUME, 3^{ME} LIVRAISON.

COPENHAGUE.

EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP.

IMPRIMERIE DE THIELE.

1903.

Prix: 5 Kr.

Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg.

Paraît par livraisons à des époques indéterminées. A mesure qu'il en paraîtra un nombre suffisant pour faire un volume, les abonnés recevront un titre imprimé en même temps qu'une table des matières, avec l'indication de la période qu'embrasse le volume.

Études sur les enzymes protéolytiques de l'orge en germination (du malt)¹.

Par

Fr. Weis.

I.

Introduction.

Historique de la question. Le Problème.

Lorsqu'à la demande de mon chef de laboratoire défunt, le professeur *Johan Kjeldahl*, j'ai entamé ce travail (novembre 1898) la littérature ne contenait que des indications très vagues ou absolument négatives sur l'existence d'une enzyme protéolytique dans l'orge en germination et dans le malt. Les expériences qui avaient donné des résultats positifs à ce sujet, avaient été reproduites par d'autres savants, qui n'avaient pu les confirmer.

Mais on continuait de parler de l'enzyme comme d'une chose existante, soit qu'on eût plus de confiance dans les indications positives, soit qu'on concluât, par analogie, qu'une telle enzyme devait se trouver dans l'orge en germination. On lui avait même, d'avance, donné un nom: la *peptase*.

En effet, on avait démontré l'existence d'enzymes protéolytiques dans différentes autres plantes: la papaïne dans le latex de *Carica papaya* (Wurtz 1879, Sidney Martin 1883, et d'autres); la bromeline dans le fruit d'*Ananassa sativa* (Marcano 1891, Chittenden 1894); de différentes soi-disant trypsines végétales, parmi lesquelles il faudra, d'après tout leur mode d'action, placer aussi les deux déjà nommées; on les trouve dans les graines non germées et en germination des vesces (Gorup-Besanez 1874), des lupins (Gorup-Besanez 1874, Green 1887), de *Ricinus communis* (Green 1890); dans le fruit de *Cucumis utilissimus* (Green 1892); dans les sécrétions de plantes insectivores (*Nepenthes*, *Drosera*, *Dionæa*, *Pinguicula*) (Darwin 1872 et 1888, Hooker 1874, Lawson-Tait 1875, Vines 1877 et

¹) Thèse publiée et soutenue, pour le doctorat ès sciences, à l'Université de Copenhague, le 28 Novembre 1902.

1897, et d'autres)¹⁾. — On savait que, pendant la transformation, dans les plantes, des albuminoïdes, il se produit, par des dédoublements souvent profonds, des peptones et des corps amidés (v. en particulier les études d'E. Schulze et de ses élèves) analogues à ceux qui se produisent dans l'organisme animal sous l'action du suc gastrique et du suc pancréatique. Il était donc naturel de supposer que des enzymes protéolytiques étaient généralement répandues dans le règne végétal et spécialement que, dans l'orge en germination et dans le malt, il y en avait une qui aurait de l'importance pour la germination et qui, entre autres choses, déterminerait la teneur en matières azotées du moût et de la bière.

Il est vrai qu'au courant de 1899 on nia catégoriquement l'existence de cette enzyme (v. plus loin). Mais ces dénégations n'avaient pour effet que la production d'expériences décisives en faveur des indications positives. Au courant de 1900 ces matériaux abondent.

Dans le résumé historique qu'avant de parler de mes propres expériences je vais tracer aux pages suivantes, je me bornerai, autant que possible, à la littérature sur des enzymes protéolytiques²⁾ dans les grains d'orge mûr et en germination et dans le malt, tout tentant qu'il soit de donner un aperçu de toutes nos connaissances des enzymes protéolytiques du règne végétal. Mais comme Green, dans son excellent livre déjà nommé (*The soluble ferments and fermentation*), vient d'en donner un, ce serait aussi, sans doute, superflu.

Dans leurs ouvrages de 1874 et 1875³⁾, Gorup-Besanez et H. Will ont les premiers indiqué la présence d'une enzyme protéolytique dans l'orge en germination. Ils ont examiné de différentes semences, surtout celles de vesces, mais aussi celles de l'orge non germée et de l'orge en germination. La dernière était sous la forme de malt touraillé clair et de malt séché à l'air.

Voici comment ils en composent des préparations d'enzyme: On verse de l'alcool à 96 p. c. sur des grains finement pulvérisés, et on laisse reposer pendant 48 heures. Décantant l'alcool, on fait sécher à une chaleur douce. La poudre séchée est intimement mélangée avec de la glycérine de consistance sirupeuse. On fait agir la glycérine de 36 à 48 heures. L'extrait est coulé. Le restant est pressuré

¹⁾ Voir J. Reynolds Green: *The soluble ferments and fermentation*. Cambridge 1899, p. 195. On y trouve aussi une bibliographie détaillée.

²⁾ Aucun des auteurs qui se sont occupés de cette question ne suppose l'existence de plus d'une enzyme protéolytique (la peptase), tandis que je pense pouvoir alléguer de fortes raisons pour l'existence de deux enzymes, pour le moins.

³⁾ Gorup-Besanez et Will: *Ber. d. d. chem. Gesellsch.* VII, 1478 (1874) et VIII, 1510 (1875).

doucement. Les liquides obtenus sont réunis, coulés et versés, goutte à goutte, dans une éprouvette haute avec 8 parties d'alcool et 1 partie d'éther. On laisse le précipité formé sous l'alcool pendant 2 à 3 jours; on filtre et, pour dépurer ultérieurement, on le lave à l'alcool, et on le traite de nouveau avec de la glycérine. La plus grande partie se dissout dans la glycérine. Le restant insoluble donne toutes les réactions d'albumine. On précipite de nouveau l'enzyme de la dissolution de glycérine au moyen d'un mélange d'alcool et d'éther. Elle apparaît comme un beau précipité blanc granuleux. Elle contient de l'azote et du soufre. A l'incinération, elle laisse beaucoup de cendres. Elle est soluble dans la glycérine et dans l'eau.

On ajoute quelques gouttes de la dissolution d'enzyme à de la fibrine de sang bien lavée et gonflée d'avance dans de l'acide chlorhydrique à 0.2 p. c. et qui se trouve dans une telle solution d'acide chlorhydrique. Au bout de quelques minutes, et déjà à la température ambiante, les contours des filaments fibrineux disparaissent. Au bout de 1 à 2 heures, la plupart en sont dissous. Une action prolongée et l'accroissement de la température à 35°—39° ne semblent pas amener de changements ultérieurs. Les solutions filtrées donnent toutes les réactions de peptones „bien prononcées“. Mais de la fibrine gonflée, traitée avec de l'acide chlorhydrique à 0.2 p. c. seul, ne s'était, au bout de plusieurs heures, que très peu changée, sans perdre sa consistance floconneuse et presque translucide.

A d'autres expériences ils font agir l'enzyme, dissoute dans de l'acide chlorhydrique à 0.2 p. c., sur des cubes de blanc d'œuf bouilli. Au bout de 24 à 48 heures d'action, à la température ambiante: „les bords étaient distinctement translucides et entamés, le liquide donnant toutes les réactions de peptones“.

En neutralisant les filtrés des expériences on obtenait parfois un faible précipité. Mais, dans la plupart des cas, on ne pouvait plus constater la présence de l'albumine inaltérée dans les solutions. Au contraire, à l'ébullition et à la neutralisation, les filtrés restaient, à l'ordinaire, parfaitement clairs ne donnant de précipité ni avec les acides minéraux, ni avec le ferrocyanure de potassium, ni avec le sulfate de cuivre, mais présentant la réaction du biuret absolument pure. La formation de leucine, de tyrosine, d'asparagine n'était pas reconnaissable, même au bout de plusieurs jours d'action de l'enzyme de la graine de vesce, laquelle autrement, parmi les objets examinés, donnait les réactions de beaucoup les plus fortes.

Ces résultats n'étaient atteints, pour l'orge, qu'avec du malt touraillé clair. On ne pouvait démontrer la présence de l'enzyme peptonisante dans l'orge non germée, ni dans le malt séché à l'air.

1897, et d'autres)¹⁾. — On savait que, pendant la transformation, dans les plantes, des albuminoïdes, il se produit, par des dédoublements souvent profonds, des peptones et des corps amidés (v. en particulier les études d'E. Schulze et de ses élèves) analogues à ceux qui se produisent dans l'organisme animal sous l'action du suc gastrique et du suc pancréatique. Il était donc naturel de supposer que des enzymes protéolytiques étaient généralement répandues dans le règne végétal et spécialement que, dans l'orge en germination et dans le malt, il y en avait une qui aurait de l'importance pour la germination et qui, entre autres choses, déterminerait la teneur en matières azotées du moût et de la bière.

Il est vrai qu'au courant de 1899 on nia catégoriquement l'existence de cette enzyme (v. plus loin). Mais ces dénégations n'avaient pour effet que la production d'expériences décisives en faveur des indications positives. Au courant de 1900 ces matériaux abondent.

Dans le résumé historique qu'avant de parler de mes propres expériences je vais tracer aux pages suivantes, je me bornerai, autant que possible, à la littérature sur des enzymes protéolytiques²⁾ dans les grains d'orge mûr et en germination et dans le malt, tout tentant qu'il soit de donner un aperçu de toutes nos connaissances des enzymes protéolytiques du règne végétal. Mais comme Green, dans son excellent livre déjà nommé (*The soluble ferments and fermentation*), vient d'en donner un, ce serait aussi, sans doute, superflu.

Dans leurs ouvrages de 1874 et 1875³⁾, Gorup-Besanez et H. Will ont les premiers indiqué la présence d'une enzyme protéolytique dans l'orge en germination. Ils ont examiné de différentes semences, surtout celles de vesces, mais aussi celles de l'orge non germée et de l'orge en germination. La dernière était sous la forme de malt touraillé clair et de malt séché à l'air.

Voici comment ils en composent des préparations d'enzyme: On verse de l'alcool à 96 p. c. sur des grains finement pulvérisés, et on laisse reposer pendant 48 heures. Décantant l'alcool, on fait sécher à une chaleur douce. La poudre séchée est intimement mélangée avec de la glycérine de consistance sirupeuse. On fait agir la glycérine de 36 à 48 heures. L'extrait est coulé. Le restant est pressuré

¹⁾ Voir J. Reynolds Green: *The soluble ferments and fermentation*. Cambridge 1899, p. 195. On y trouve aussi une bibliographie détaillée.

²⁾ Aucun des auteurs qui se sont occupés de cette question ne suppose l'existence de plus d'une enzyme protéolytique (la peptase), tandis que je pense pouvoir alléguer de fortes raisons pour l'existence de deux enzymes, pour le moins.

³⁾ Gorup-Besanez et Will: *Ber. d. d. chem. Gesellsch.* VII, 1478 (1874) et VIII, 1510 (1875).

doucement. Les liquides obtenus sont réunis, coulés et versés, goutte à goutte, dans une éprouvette haute avec 8 parties d'alcool et 1 partie d'éther. On laisse le précipité formé sous l'alcool pendant 2 à 3 jours; on filtre et, pour dépurer ultérieurement, on le lave à l'alcool, et on le traite de nouveau avec de la glycérine. La plus grande partie se dissout dans la glycérine. Le restant insoluble donne toutes les réactions d'albumine. On précipite de nouveau l'enzyme de la dissolution de glycérine au moyen d'un mélange d'alcool et d'éther. Elle apparaît comme un beau précipité blanc granuleux. Elle contient de l'azote et du soufre. A l'incinération, elle laisse beaucoup de cendres. Elle est soluble dans la glycérine et dans l'eau.

On ajoute quelques gouttes de la dissolution d'enzyme à de la fibrine de sang bien lavée et gonflée d'avance dans de l'acide chlorhydrique à 0.2 p. c. et qui se trouve dans une telle solution d'acide chlorhydrique. Au bout de quelques minutes, et déjà à la température ambiante, les contours des filaments fibrineux disparaissent. Au bout de 1 à 2 heures, la plupart en sont dissous. Une action prolongée et l'accroissement de la température à 35°—39° ne semblent pas amener de changements ultérieurs. Les solutions filtrées donnent toutes les réactions de peptones „bien prononcées“. Mais de la fibrine gonflée, traitée avec de l'acide chlorhydrique à 0.2 p. c. seul, ne s'était, au bout de plusieurs heures, que très peu changée, sans perdre sa consistance floconneuse et presque translucide.

A d'autres expériences ils font agir l'enzyme, dissoute dans de l'acide chlorhydrique à 0.2 p. c., sur des cubes de blanc d'œuf bouilli. Au bout de 24 à 48 heures d'action, à la température ambiante: „les bords étaient distinctement translucides et entamés, le liquide donnant toutes les réactions de peptones“.

En neutralisant les filtrés des expériences on obtenait parfois un faible précipité. Mais, dans la plupart des cas, on ne pouvait plus constater la présence de l'albumine inaltérée dans les solutions. Au contraire, à l'ébullition et à la neutralisation, les filtrés restaient, à l'ordinaire, parfaitement clairs ne donnant de précipité ni avec les acides minéraux, ni avec le ferrocyanure de potassium, ni avec le sulfate de cuivre, mais présentant la réaction du biuret absolument pure. La formation de leucine, de tyrosine, d'asparagine n'était pas reconnaissable, même au bout de plusieurs jours d'action de l'enzyme de la graine de vesce, laquelle autrement, parmi les objets examinés, donnait les réactions de beaucoup les plus fortes.

Ces résultats n'étaient atteints, pour l'orge, qu'avec du malt touraillé clair. On ne pouvait démontrer la présence de l'enzyme peptonisante dans l'orge non germée, ni dans le malt séché à l'air.

Depuis ces recherches, on a généralement considéré que la présence de l'enzyme protéolytique dans les graines en germination était démontrée à n'en pas douter. Dans une étude publiée au „Journal für Landwirtschaft 1881“ (Über das Vorkommen von Peptonen in den Pflanzen) E. Schulze et Barbieri partent de la supposition que l'existence des peptones, dont ils ont démontré la présence dans les différentes parties des plantes, est due à l'action d'un ferment protéolytique¹⁾.

Les expériences de Gorup et Will ont été reproduites par C. Krauch en 1879 („Beiträge zur Kenntniss der ungeformten Fermente im Pflanzenreich“) ²⁾. Celui-ci, cependant, n'a pu montrer la présence de ferments peptonisants dans aucune des différentes parties des plantes, un grand nombre desquelles il a examiné. Pour l'orge, il n'a recherché que l'enzyme diastatique, mais il rapporte une étude non-imprimée de H. Will suivant laquelle la recherche de peptase dans la semence du pinier, du maïs, des fèves, des amandes, d'après la méthode de Gorup, avait donné partout un résultat négatif.

En 1882, C. Krauch a publié une seconde étude traitant, en particulier, les enzymes peptonisantes des plantes („Über peptonbildende Fermente in den Pflanzen“) ³⁾. Il y prétend avoir reproduit exactement les expériences de Gorup tant pour les graines de vesce que pour le malt touraillé. Quant aux filaments fibrineux, il a bien reconnu une diminution de volume mais pas de disparition. La diminution est due, à son avis, à un rétrécissement qu'on observe aussi en mettant des filaments fibrineux gonflés dans un extrait glycérinien de feuilles et de boutons (ceux-ci, à l'avis de Krauch, n'ont pas d'action fermentative peptonisante). La réaction du biuret n'est pas due non plus à la transformation de la fibrine. En effet, si on porte la même quantité d'enzyme a) dans l'acide chlorhydrique dilué seul ou b) dans la fibrine + l'acide chlorhydrique, on aura, au bout d'un temps plus ou moins long, des filtrés qui donnent la réaction du biuret de même intensité; celle-ci, par conséquent, est due à la préparation d'enzyme même.

Cependant, Krauch ne décrit pas ses expériences en détail, et, dans son premier travail, il dit que, quant à l'action diastatique, il s'est servi de méthodes indiquées par Erlenmeyer (extrait par une solution saturée d'acide salicylique) et par Duquesnel (chauffage au bain-marie à 70°) pour ses préparations d'enzyme. Dans ce cas, il peut être sûr d'avoir détruit les enzymes protéolytiques qui, d'après mes re-

¹⁾ Plus tard, on a contesté la présence, en quantité notable, de vraies peptones dans les plantes.

²⁾ C. Krauch: Landwirtsch. Versuchst. XXIII 77—104 (1879).

³⁾ C. Krauch: Landwirtsch. Versuchst. XXVII 383 (1882).

cherches, sont extrêmement sensibles à l'acide salicylique au-delà des concentrations très faibles, et qui sont complètement détruites à 70°.

D'autre part, il faut avouer que les expériences de Gorup-Besanez ne sont pas particulièrement convaincantes: par sa méthode pour la préparation de peptase il a, sans doute, toujours beaucoup affaibli cette enzyme et souvent il l'a complètement détruite, à en juger par ses essais négatifs avec du malt séché à l'air.

La même année que Krauch communiquait ses derniers résultats négatifs (1882), J. Kjeldahl avait entamé la question comme faisant partie de la grande série de recherches projetées sur les matières azotées de la bière et du moût. D'autres travaux, et surtout sa méthode pour le dosage de l'azote, laquelle se présentait comme une étude préparatoire de ces recherches, l'ont forcé à interrompre les études de l'enzyme protéolytique du malt. Mais déjà alors il avait obtenu des résultats extrêmement importants. Avec la permission de la Direction du Laboratoire de Carlsberg et de mon chef actuel, M. S. P. L. Sørensen, je reproduis ici ce qui se trouve là-dessus dans son journal d'expériences que, dans le temps, il avait mis à ma disposition¹⁾.

Au lieu d'essayer d'obtenir l'enzyme à l'état de pureté en précipitant par un mélange d'alcool et d'éther, etc., comme l'avaient fait ses devanciers, et reconnaissant que de telles opérations prolongées ne font qu'affaiblir le pouvoir fermentatif, Kjeldahl (en tant qu'on peut voir de son journal d'expériences) s'est décidé out de suite à se servir d'extraits frais de parties végétales, comme il l'avait fait à ses recherches de diastase. Il a préparé les extraits de la manière, à peu près, rapportée p. 125 du 1^{er} volume des présents Comptes-rendus, en faisant digérer, pendant une heure, 1 partie de malt avec 3 à 4 parties d'eau, sans addition aucune. Il a, pourtant, dans différents essais, fait entrer des extraits de malt vert, de malt séché à l'air, de malt touraillé, de touraillons, dans des proportions variées de malt et d'eau: partout il a obtenu des résultats positifs, quoiqu'avec les touraillons l'effet n'ait été que faible.

¹⁾ Il était bien de Kjeldahl, avec sa grande modestie et tout son système de recherches, de ne publier jamais des travaux restés, à son avis, sans une certaine conclusion. Ses recherches sur l'enzyme protéolytique du malt étaient, pour lui, des études d'orientation. Il a donc, pendant les longues discussions publiques de cette question, retenu ses résultats, quoiqu'il n'ait pas douté de l'existence de l'enzyme, de laquelle il possédait des preuves certaines. Quand j'ai été nommé son préparateur, il m'a demandé de poursuivre le problème et de trouver, autant que possible, les lois de l'action de l'enzyme d'après des principes pareils à ceux qu'il avait suivis lui-même dans ses recherches sur la diastase et l'invertase.

Il a fait agir ses extraits sur des solutions de gluten de froment, obtenu, d'après la méthode de Ritthausen, par un lavage à la main de la farine de froment, dans un liquide acidulé de 0.2 p. c. d'acide chlorhydrique, d'acide acétique ou d'acide lactique.

Afin de poursuivre l'action d'enzyme, il a fini par choisir comme précipitant le sulfate de cuivre. Après avoir précipité, il neutralise avec de l'hydrate de sodium et du sel de Seignette (précipitant ainsi le gluten, mais non pas ses produits de dédoublement), après avoir soigneusement examiné d'avance la valeur des précipitants des matières albuminoïdes alors en usage. Il prépara le précipitant de 25^{gr} de sulfate de cuivre par litre d'eau, et la solution d'hydrate de sodium + de sel de Seignette était telle qu'on l'emploie à la liqueur de Fehling (63^{gr} d'hydrate de sodium et 173^{gr} de sel de Seignette par 500^{cc}), mais diluée dans la proportion de 1 à 10. Après la précipitation, on versa d'abord sur le filtre le liquide suspendu, puis le précipité, au moyen d'eau, enfin on remplit le filtre deux fois d'eau. Au dernier lavage le filtré se troubla un peu. On sécha le filtre avec le précipité au poids constant à la chaleur de 100°. On pesa, puis on calcina. On déduisit les cendres déterminées consistant principalement en cuivre. Une partie du gluten, se changeant sous l'influence de l'enzyme, se déroba à la précipitation par le sulfate de cuivre.

Dans les essais suivants on employait 10^{cc} d'une dissolution de gluten à 2 p. c., dans une solution aqueuse d'acide lactique à 0.4 p. c., et 10^{cc} d'extrait de malt, fait de 1 partie de malt touraillé pour trois d'eau. Les essais où on avait détruit d'avance le ferment par la chaleur sont nommés par Kjeldahl „passifs“ par opposition aux autres, nommés „actifs“. Les indications suivantes sont données d'après son journal d'expériences:

„Essais de l'influence de la température. Une heure d'action. Les liquides des expériences mêlés à froid:

	dépôt cuivrique	transformé
18° passif	185 milligrammes	0 milligrammes
18° actif.....	174 —	11 —
40° —	102 —	83 —
50° —	71 —	114 —
60° —	88 —	97 —
60° passif	184 —	1 —

Il s'ensuit de l'accord entre les essais passifs faits à 18° et à 60° que l'augmentation de température seule n'exerce aucune influence sensible.

	dépôt cuivrique	transformé
49° actif.....	57 milligrammes	114 milligrammes
59° —	78 } 78 —	93 —
— —	79 }	
64 ¹ / ₂ ° —	112 } 114 —	57 —
— —	117 }	
passif	171 —	0 —

Solution de gluten et extrait de malt chauffés d'avance à la température d'expérience. Une heure d'action:

	dépôt cuivrique	transformé
44° actif.....	115 milligrammes	68 milligrammes
50 ¹ / ₂ ° —	96 } 96 —	87 —
— —	96 }	
55° —	98 } 101 —	82 —
— —	104 }	
60° —	124 } 127 —	56 —
— —	130 }	
65° —	161 } 162 —	21 —
— —	162 }	
70° —	172 —	11 —
— passif	182 } 183 —	0 —
— —	184 }	

Donc l'optimum entre 50¹/₂° et 55°.

Essais sur l'influence du temps. Chauffage d'avance¹⁾.

	dépôt cuivrique	transformé
passif	177 milligrammes	0 milligrammes
5 min.....	161 } 165 —	12 —
—	168 }	
10 min.....	151 } 153 —	24 —
—	155 }	
20 min.....	131 } 133 —	44 —
—	136 }	
30 min.....	121 —	56 —
1 heure.....	112 —	65 —
3 heures	74 —	103 —
6 —	50 —	127 —

¹⁾ Ici pas plus qu'aux séries d'essais suivantes, le journal ne donne pas d'indications de la température. Celle-ci a, sans aucun doute, été dans le voisinage de l'optimum trouvé.

Essais sur l'influence de la quantité de ferment. Cinq quarts d'heure d'action.

	dépôt cuivrique	
10 ^{cc} de solution de gluten + 10 ^{cc} d'extrait de malt, passif	166	} 168 milligr.
— — — — —	171	
10 ^{cc} de solution de gluten.....	146	} 147 —
— — — — —	147	
10 ^{cc} de sol. de gluten + 2 ^{cc} d'extrait de malt = 20 ^{cc} ¹⁾	123	} 131 ? —
— — — — —	140	
10 ^{cc} de sol. de gluten + 4 ^{cc} d'extrait de malt = 20 ^{cc}	121	} 122 —
— — — — —	122	
10 ^{cc} de sol. de gluten + 6 ^{cc} d'extrait de malt = 20 ^{cc}	100	} 100 —
— — — — —	100	
10 ^{cc} de sol. de gluten + 8 ^{cc} d'extrait de malt = 20 ^{cc}	87	87 —
10 ^{cc} de sol. de gluten + 10 ^{cc} d'extrait de malt = 20 ^{cc}	62	62 —

10^{cc} d'extrait de malt donnant $168 \div 147 = 21^{\text{mg}}$ de précipité cuivrique 2^{cc}, 4^{cc}, 6^{cc}, 8^{cc} donneront 4^{mg}, 8^{mg}, 13^{mg}, 17^{mg} respectivement. L'effet de 2^{cc}, 4^{cc}, 6^{cc}, 8^{cc}, 10^{cc} d'extrait de malt est donc une diminution de $151 \div 131 = 20$, $155 \div 122 = 33$, $160 \div 100 = 60$, $164 \div 87 = 77$, $168 \div 62 = 106$. 10^{mg} par centimètre cube donneront pour

2 ^{cc}	20	(20) mg
4 ^{cc}	40	(33) mg
6 ^{cc}	60	(60) mg
8 ^{cc}	80	(77) mg
10 ^{cc}	100	(106) mg

A l'exception des 4^{cc} la proportionnalité est assez bonne

Comparaison avec la pepsine. 1^{er} de pepsine dissous dans 200^{cc} d'acide chlorhydrique à 3 millièmes:

	dépôt cuivrique	
10 ^{cc} de sol. de pepsine + 10 ^{cc} de sol. de gluten, passif. . . (ne filtre pas)		
— — — — —	après 1 heure à 40°	54
— — — — —	— — —	54
— — — — —	— — —	à 50°
— — — — —	— — —	43
— — — — —	— — —	44

¹⁾ On portait toujours le volume à 20^{cc} par l'addition d'eau.

10 ^{cc} d'extrait de malt + 10 ^{cc} de sol. de gluten, après 1 heure, à 40°	125	} 126 ^{mg}
— — — — — — — — — —	127	
— — — — — — — — — —	à 50°	} 84 ^{mg}
— — — — — — — — — —	82	
— — — — — — — — — —	85	} 84 ^{mg}
— — — — — — — — — —	passif	
— lavage répété (5 fois).....	171 ^{mg}	
— sans neutralisation complète.....	175 ^{mg}	

Ainsi l'action de la pepsine est aussi plus forte à 50° qu'à 40°.

Un lavage répété ne produit qu'une diminution peu importante du poids. La neutralisation incomplète n'en produit point. —

Par ces expériences Kjeldahl a parfaitement démontré l'existence, dans le malt, d'une enzyme protéolytique, et déjà il a tracé d'importantes lignes fondamentales de sa dépendance d'agents extérieurs. Si on avait publié ces résultats, on aurait pu s'épargner un grand travail fait plus tard pour fournir des preuves contre son existence.

En 1887, nous venons de le dire, J. Reynolds Green a démontré, d'une manière incontestable, la présence d'une enzyme protéolytique dans les graines et dans les plantules de *Lupinus hirsutus*¹⁾ et, plus tard (1890 et 1892), dans *Ricinus communis*²⁾ et *Cucumis utilisissimus*³⁾ Je n'aurais pas parlé ici de ces recherches, si elles n'avaient pas, par leur méthode, exercé une influence décisive sur d'autres travaux ayant pour objet l'orge en germination. Après avoir délivré, au moyen de la dialyse, un extrait végétal des matières diffusibles, entre autres de celles (peptones) qui donnent la réaction du biuret, Green constate une nouvelle formation de peptone et la production de composés cristallins: la leucine et la tyrosine, si on ajoute à l'extrait en question de la fibrine et de l'acide chlorhydrique à 0.2 p. c. On a donc la preuve que les graines en germination, aussi bien que les graines non germées, peuvent contenir des enzymes protéolytiques d'un caractère plutôt trypsique. Rien ne s'oppose donc a priori à la supposition qu'il pourrait en être de même de l'orge en germination.

Les travaux de Green ont d'autant plus d'importance qu'ils ne s'appuient pas exclusivement sur le fait qu'on obtient la réaction du biuret dans la partie dialysée, mais aussi sur la constatation des produits de dédoublement plus profonds de substances albuminoïdes:

¹⁾ Green: „On the changes in the proteids in the seed which accompany germination. Philos. Transactions CLXXVIII B 39 (1887).

²⁾ Green: On the germination of the seeds of the Castor-oil plant. Proceed. Roy. Soc. XXXXVIII 370 (1890).

³⁾ Green: On the occurrence of vegetable trypsin in the fruit of *Cucumis utilisissimus*. Annals of Botany VI 195 (1892).

la leucine et la tyrosine tellement caractéristiques à l'action du suc pancréatique (de la trypsine). Gorup-Besanez, Krauch et d'autres, dans des recherches plus récentes, ont, sans doute, trop appuyé sur la réaction du biuret comme criterium de la protéolyse. On peut s'en servir à la fermentation pepsique, mais quand il s'agit des actions d'enzymes traitées ici et qui sont assurément d'une nature plus profonde, les substances donnant la réaction du biuret ne paraissent, surtout si l'expérience est prolongée, qu'en très petite quantité, se décomposant très vite et donnant des composés non-protéiques (bases hexoniques, amines, etc.).

C'est Rich. Neumeister¹⁾ qui a publié (1894) l'ouvrage suivant, qui traite de l'existence de l'enzyme protéolytique dans le règne végétal et qui s'occupe aussi d'orge en germination.

Il a recours à une méthode particulière pour la préparation de l'enzyme, profitant de l'observation de Wittich et de Wurtz qui ont montré que les filaments fibrineux frais extraient les enzymes protéolytiques des solutions en les absorbant ou en les condensant sur leur surface. Il broie les parties végétales (graines en germination ou plantules) avec du sable dans un mortier. Il obtient ainsi une bouillie fine „de réaction nettement acide“. Il additionne d'eau. Au bout de plusieurs heures on presse la masse à travers un linge. On porte l'extrait troublé dans un flacon laveur de Drechsel contenant des filaments fibrineux. Au moyen d'un aspirateur on fait passer, pendant deux heures, de l'air à travers le liquide de manière à en mettre toutes les parties en contact avec les filaments fibrineux. On enlève la liqueur. Les filaments sont lavés à l'eau et mis dans un flacon contenant de l'acide oxalique à 0.8 p. c. On met le flacon dans une étuve à température constante. La fibrine se dissout maintenant complètement au courant de quelques heures, tandis qu'elle se maintient presque inaltérée, même au bout de deux jours, dans des essais de contrôle simultanés, où on la laisse dans de l'acide oxalique dans des conditions identiques à une chose près: elle n'a pas été en contact d'abord avec une solution d'enzyme (extrait végétal).

Neumeister examine de cette façon des orges d'origine différente qu'il trempe dans l'eau, puis fait germer dans du sable humide ou de la sciure mouillée, jusqu'à ce que la plumule et la racine aient atteint une longueur totale d'environ 5^{cm}. Dans ces circonstances, cependant, le pouvoir fermentatif n'est que faible, aucune peptonisation ne se laissant signaler dans la solution de fibrine, même

¹⁾ R. Neumeister: Über das Vorkommen und Bedeutung eines eiweiss-lösendes Enzyms in jugendlichen Pflanzen. Zeitschr. f. Biologie XXX 447 —463 (1894).

après cinq jours d'action. D'après l'auteur, elle ne contient, pendant ce temps, en dehors d'une prépondérance de syntonines, que des albumoses primaires — ce qui aussi est un résultat.

Au contraire, en traitant de l'orge dont la plumule verte avait déjà 16—20^{cm} de long il obtient, à plusieurs reprises, des extraits très riches en ferments, la fibrine se dissolvant complètement au bout de 2 ou 3 heures et fournissant régulièrement de la peptone au bout de 48 heures. Dans un cas isolé où la plumule et la radicule avaient à peine 3^{cm} de long, il observe, déjà au bout d'une heure, la dissolution complète de la fibrine, pouvant constater, après 24 heures, une peptonisation considérable. Au contraire, il n'obtient que des résultats négatifs avec des plantules d'orge dont la plumule et la radicule n'étaient longues que de 0.5—1^{cm}, ainsi qu'avec de l'orge non germée et mouillée.

Neumeister se sert de l'acide oxalique de 0.8 p. c. au lieu de l'acide chlorhydrique qu'avaient employé ses prédécesseurs, parce qu'il croyait avoir constaté que l'enzyme n'agit, dans de l'acide chlorhydrique de 0.2 p. c., qu'au commencement, se détruisant peu à peu, tandis que l'acide oxalique de 0.4—0.8 p. c. exerce une influence beaucoup plus favorable. Il trouve dans l'action de l'acide chlorhydrique sur l'enzyme de la ressemblance avec la trypsine. Mais s'il se sert d'une solution de sel de cuisine (neutre) ou d'une solution de 0.2 p. c. de soude (alcaline), toute action s'arrête. Il en conclut: „l'enzyme n'est donc pas de nature trypsique.“

Il est donc d'avis que les plantules d'orge contiennent une enzyme protéolytique, mais seulement à la période d'une germination avancée. La raison pour laquelle Gorup-Besanez l'a trouvée au malt touraillé, mais non pas au malt séché à l'air, sera alors que celui-là a germé plus longtemps que celui-ci, sans qu'il s'en soit aperçu¹⁾.

En 1897, W. Johannsen²⁾, dans des expériences de macération, a démontré l'existence d'une enzyme protéolytique amidogène dans des grains d'orge mûrissants qu'on avait narcotisés au moyen d'une

¹⁾ Dans une étude de Fermi et Buscaglioni: Die proteolytischen Enzyme im Pflanzenreich, Centralbl. f. Bakteriol. II. Abt. V 24, 63, 91, 125, 145 (1899), étude dans laquelle il ne s'agit pas autrement d'orge, il est dit (sans référence à une étude déterminée) que Mroczkowski (probablement une des premières années après 1890) a extrait de l'orge en germination une enzyme décomposant la fibrine autant à réaction neutre qu'à réaction alcaline, agissant le mieux, cependant, en la présence de l'acide chlorhydrique à 0.2 p. c.

²⁾ W. Johannsen: Studier over Planternes periodiske Livsyringer I. Det danske Videnskabernes Selskabs Skrifter [6] mathem.-naturv. Afd. VIII (5) 275—394, Copenhagen (1897).

dose pas trop faible de narcotique (éther, chloroforme). — Si donc le pouvoir fermentatif protéolytique se trouve dans le grain d'orge pas mûr, il faut s'attendre à priori à le trouver aussi dans le grain en germination, quand même, dans le grain complètement mûr, il peut être affaibli au point à être difficilement observable.

Voilà, à ma connaissance, toutes les recherches qu'on avait publiées sur la question lorsque j'ai entamé mes travaux, et les recherches qui ont eu de l'influence sur le plan et la marche de ces travaux. Après les recherches de Kjeldahl je pouvais, cela va sans dire, négliger les indications négatives. Je ne me suis pas beaucoup occupé des méthodes de mes prédécesseurs si ce n'est de celle de Kjeldahl, celui-ci ayant montré une voie particulièrement féconde pour poursuivre l'action de l'enzyme et pour en élucider la nature.

Depuis 1899 on a publié sur la question un assez grand nombre de travaux auxquels je ne m'arrêterai pas longtemps, partie parce qu'ils sont restés sans influence sur ma méthode, partie parce que je trouve plus pratique de renvoyer la comparaison de mes résultats avec ceux des autres à la partie spéciale du présent travail.

Boleslaw de Verbno Laszcynski (Ueber das Vorkommen eines peptonisierenden Enzyms (Peptase) im Malz und Versuche zur Trennung der stickstoffhaltigen Bestandteile im Malz, Würze und Bier)¹⁾ arrive aux résultats que voici: „1° Il n'y a pas moyen de démontrer l'existence d'une enzyme peptonisante au malt. 2° Il n'y a pas des quantités perceptibles de peptones au malt, au moût, à la bière. 3° La solubilité des matières azotées du malt dépend des conditions d'extraction“. Entre autres choses, il a repris les expériences de Neumeister décrites plus haut, auxquelles on laisse agir l'enzyme sur la fibrine dans une solution à 0.8 p. c. d'acide oxalique après l'avoir extraite d'un extrait de malt au moyen des filament fibreux mêmes. Des essais avec des plantules d'orge vertes, longues de 6—9^{cm} ne donnaient pas la réaction du biuret, même au bout de 6 heures à 40°. Des essais avec du malt séché à l'air donnaient la réaction du biuret, mais, pas plus que pour des essais avec du malt touraillé foncé, il n'y avait de dissolution de fibrine, tandis qu'un essai parallèle avec de la pepsine produisit, presque tout de suite, une dissolution complète. Enfin, dans un essai, auquel, d'après Grützner²⁾, on colora de carmine la fibrine en la digérant après avec 10^{gr} de malt pendant deux heures, il obtint un filtré incolore et dans lequel l'azote ne s'était augmenté que de 24.53 à 25.21 = 0^{mg}.7. — De plus, il a fait des expériences de

¹⁾ Laszcynski: Zeitschr. für das ges. Brauwesen 22 Jahrg. p. 71, 85, 123, 140 (1899).

²⁾ Grützner: Archiv f. Physiologie VIII, 452 (1874).

brassage de durées différentes avec du malt touraillé clair à des températures variées dosant, après l'extraction, dans de différents essais, l'azote total, l'azote coagulable et l'azote précipité successivement par l'hydrate d'oxyde cuivrique (matières protéiques), par le sulfate de zinc (albumoses), par l'acide phosphotungstique (peptones et ammoniaque). Mais il part tout le temps de la supposition erronée que l'action de l'enzyme est la même que celle de la pepsine. Voici ce qu'il dit à la page 84: „Bedeutend erniedrigt würde der Phosphorwolframsäurestickstoff, während man doch bei einer enzymatischen Einwirkung zweifellos eine Erhöhung desselben durch Bildung von Albumosen und Peptonen hätte erwarten sollen. Die Annahme, dass die Spaltung der Proteinstoffe bereits zur Bildung von Amiden fortgeschritten sei, ist ganz unzulässig. Ein derartiger Vorgang würde die Anwesenheit eines Enzyms voraussetzen, das noch weit energischer auf die Eiweisskörper des Malzes einwirkt als Pepsin“. Ses essais n'admettent, en vérité, aucune comparaison et ne prouvent rien, à moins que ce ne soit la présence d'une enzyme formant des composés qui se dérobent à la précipitation par l'acide phosphotungstique, ce qui s'accorde avec mes propres résultats. Si, au moyen de la réaction du biuret, il n'a pu démontrer l'existence, à la bière et au moût, de peptones, si ce n'est en quantités minimales, c'est un résultat de quelque importance et qu'il faut noter.

La même année W. Loë publie une étude¹⁾ („Enthält das Malz ein peptonisierendes Enzym?“) qu'il termine par la déclaration catégorique que voici: „1° Ein eiweisslösendes Enzym im Malz existiert nicht. 2° Die im Malz vorhandenen, im Wasser löslichen Eiweisskörper werden während des Keimungsprozesses gebildet, und erscheint es wahrscheinlich, dass die Menge der in Lösung gegangenen Stoffe von der Art und Dauer der Extraction abhängig ist“. Il fonde ces propos sur des expériences dans lesquelles il prépare des extraits d'orge moulue, partie avec des extraits de malt, partie avec de l'eau. Il ne détermine que l'azote total, se servant des chiffres trouvés pour calculer la protéine(I). Il en obtient alors la même quantité, qu'il se serve d'extrait de malt ou d'eau. — Ces essais sont sans valeur aucune. J'en parle ici pour être complet seulement.

Ces deux travaux sont sans importance, c'est vrai, mais ils ont contribué à avancer la solution de la question. En effet, il y en avait qui se mettaient à l'œuvre avec d'autant plus de zèle qu'ils ne se sentaient pas convaincus par des résultats obtenus ainsi.

Lors de la publication de l'étude de Loë (au commencement d'avril 1899) j'avais à ma disposition, en dehors des anciennes expériences

¹⁾ W. Loë: Zeitschr. f. das ges. Brauwesen 22 Jahrg. 212 (1899).

de Kjeldahl, un grand nombre d'expériences nouvelles qui ne laissent aucun doute sur l'existence d'une enzyme protéolytique dans le malt. J'avais décidé de n'en rien publier avant d'avoir donné à mon travail une certaine conclusion. Cependant, un assez grand nombre d'études¹⁾, auxquelles je reviendrai plus loin, ayant paru au courant de l'été 1900, je me vis forcé de donner une communication provisoire de quelques-unes de mes expériences (Über das proteolytische und ein eiweisscoagulirendes Enzym in keimender Gerste (Malz)) à la Zeitschr. für physiol. Chemie XXXI, 79—97, communication remise le 20 septembre 1900.

Windisch et Schellhorn démontrent l'existence de l'enzyme protéolytique en faisant agir de l'extrait de malt sur la gélatine d'après Fermi²⁾. Ils constatent que la gélatine liquide ne se coagule plus, ou que la gélatine coagulée redevient liquide, si l'extrait de malt y agit pendant un certain temps, à une température convenable et, de préférence, à réaction alcaline. D'autres essais d'auto-digestion d'extraits de malt, au contraire, donnent de meilleurs résultats en présence d'un peu d'acide, de préférence organique. Ils trouvent l'enzyme tant dans le malt touraillé que dans le malt vert et, dans des cas isolés, dans l'orge non germée, surtout si celle-ci est mal récoltée ou particulièrement riche en albumine. Ils suivent l'action de l'enzyme en la faisant agir dans un liquide contenant du thymol ou du chloroforme et en déterminant, avant et après les expériences, soit la diminution de matières albuminoïdes coagulables (en faisant bouillir), soit l'augmentation d'albumoses (en précipitant par du sulfate de zinc). En quelques cas ils déterminent les peptones (en précipitant le filtré des albumoses avec de l'acide phosphotungstique) ou le soi-disant azote amidé (en faisant bouillir les filtrés des matières albuminoïdes avec de l'acide chlorhydrique pendant une heure et en distillant l'ammoniaque formée en ajoutant de l'hydrate de sodium). — Je reviendrai plus loin en détail sur les résultats de ces expériences.

Fernbach et Hubert montrent l'existence de l'enzyme de la même manière, partie par le pouvoir qu'ont les extraits de malt de liquéfier la gélatine, partie par les changements qu'en subissent

¹⁾ Windisch und Schellhorn: Ueber das eiweisspaltende Enzym der gekeimten Gerste, Wochenschrift für Brauerei XVII 334 ss. (1900).

Fernbach et Hubert: Sur la diastase protéolytique du malt. Compt. rend. CXXX 1883—85 (23 juin 1900).

Fernbach et Hubert: De l'influence des phosphates et de quelques autres matières minérales sur la diastase protéolytique du malt. C. r. CXXXI 293 (23 Juillet 1900).

Petit et Labourasse: Sur la solubilisation des matières azotées du malt. C. r. CXXXI 349 (30 Septembre 1900).

²⁾ Cl. Fermi: Centralbl. für Bakteriologie II Abt. V 25—27 (1899).

les matières azotées, exposées à l'auto-digestion. (Ils stérilisent leurs extraits de malt en filtrant à travers des bougies Chamberland). Ils font observer que, surtout à des températures basses (40° environ), le dédoublement de la molécule albuminoïde va bien au-delà de ce qu'à l'ordinaire on appelle „peptones“, un grand nombre des composés azotés se dérobant, peu à peu, à la précipitation par l'acide phosphotungstique. — Ils nous présentent aussi d'intéressantes recherches sur l'influence exercée sur l'action de l'enzyme par les phosphates et par d'autres sels et acides minéraux. Enfin, en précipitant avec de l'alcool, ils obtiennent une substance qui est à même de transformer les matières albuminoïdes coagulables des extraits de malt soumis à l'ébullition et les matières albuminoïdes insolubles que contient l'orge.

Petit et Labourasse ont fait des expériences d'auto-digestion semblables à celles de Windisch et Schellhorn, puis, ils ont dosé l'azote de protéine, la quantité d'azote précipitable par le sulfate de zinc et par l'acide phosphotungstique, enfin celle qui, sous la forme d'ammoniaque, se laisse distiller au moyen de l'hydrate de soude après l'action de l'acide chlorhydrique dilué bouillant. Ils arrivent à des résultats pareils à ceux de leurs contemporains. Ils pensent, en outre, avoir démontré la formation d'arginine.

Dans la petite étude que j'ai publiée, j'ai communiqué des résultats concernant l'influence sur l'enzyme de la température et de quelques matières étrangères (antiseptiques, acides), ainsi que quelques essais de brassage et les changements, pendant le brassage, des matières azotées précipitables par l'acide tannique. J'ai aussi démontré l'existence d'une enzyme coagulante (présure) qu'on rencontre dans les extraits de malt conjointement avec l'enzyme protéolytique.

Enfin, j'ai encore à nommer deux études: R. Wahl a publié des recherches (à la *American Brewers' Review* 1900), que je ne connais que par des comptes-rendus¹⁾. Elles ont pour but de suivre les changements des matières albuminoïdes pendant le brassage, lesquels, à l'avis de l'auteur, sont dus à l'action de la peptase. Ehrich, dans son étude²⁾, conclut à l'existence de la peptase par suite d'expériences de brassage qu'il a faites autrefois.

On voit que, depuis ces dernières années, la question est dans l'air, et puisque l'existence de l'enzyme vient d'être affirmée de tant de côtés et que des méthodes différentes ont conduit aux mêmes résultats, il faut considérer qu'on a bien constaté cette existence. Les travaux déjà

¹⁾ Entre autres au manuel de Wahl and Henius: *American Handy-book of the Brewing, Malting and Auxiliary Trades*, pp. 424—433, 707—708. Chicago (1901).

²⁾ Ehrich: *Allg. Brauer- und Hopfenzeitung*. 1. März 1901.

nommés de Green ainsi que d'autres, plus nouveaux, de Butkewitsch¹⁾, sur les enzymes protéolytiques d'autres plantes et surtout des légumineuses, viennent confirmer la supposition que ces enzymes sont aussi répandues au règne végétal qu'au règne animal.

Problème.

M'appuyant surtout sur les expériences de Kjeldahl et partant de la supposition de l'existence d'une enzyme protéolytique dans l'orge en germination et dans le malt, je me suis donné la tâche que voici:

1° apporter des preuves ultérieures de l'existence de cette enzyme;

2° examiner quantitativement la dépendance de la protéolyse de différents agents, surtout de facteurs extérieurs;

3° procurer des renseignements sur la nature et sur l'action de l'enzyme (ou des enzymes²⁾), de manière à rendre possible la détermination de sa (ou leur) place systématique parmi les enzymes congénères connues aujourd'hui.

Dans la partie traitant les lois déterminant la dépendance d'agents extérieurs de la protéolyse on trouvera des preuves irrécusables de la supposition que c'est dans les enzymes qu'il faut chercher la cause de ce phénomène. Pendant la marche de mon travail de telles preuves ont été données aussi par d'autres recherches, par celles de Windisch et Schellhorn, de Fernbach et Hubert, de Petit et Labourasse.

Cependant, c'est de l'autre côté de la question que j'ai fait ma tâche principale: mon but essentiel est d'apporter des données de la marche de la protéolyse pareilles à celles qu'a fournies Kjeldahl pour la saccharification sous l'influence de la diastase et de l'invertase.

Pendant ce travail, un grand nombre d'autres questions, qui y sont intimement liées et dont la solution contribuerait à l'élucidation du caractère de la protéolyse, se sont présentées. Ce sont les questions qui concernent la nature, l'action, l'origine, le sort de l'enzyme (des enzymes) pendant la germination et, à la malterie, pendant la torréfaction, etc.

Pourtant, j'ai avant tout, dans ce travail, eu en vue les questions purement théoriques et qui pussent être d'importance pour l'étude des enzymes en général, sans perdre de vue l'importance pratique de ce genre de recherches, en particulier pour la technique du brassage. J'ai

¹⁾ Butkewitsch: Berichte d. d. botan. Gesellsch. XXIII 358—364 (1900) et Zeitschr. f. physiol. Chemie XXXII 1—53 (1901).

²⁾ Mes essais ayant démontré l'existence de plus d'une enzyme protéolytique.

déjà publié des expériences qui intéressent celle-ci dans la communication qui a paru à la „Zeitschrift für physiologische Chemie“ (XXXI, p. 79, 1900). Je me réserve de revenir sur ces expériences et sur d'autres plus nouvelles, qui tournent particulièrement sur la protéolyse pendant le brassage, dans une publication postérieure.

II.

Méthodes expérimentales.

Mes premiers essais d'orientation ont été faits, à peu près, d'après la méthode dont se servait Kjeldahl (v. p. 137). Cependant, au lieu du malt touraillé, j'employais du malt vert écrasé (une partie pour deux d'eau) pour les extraits contenant les enzymes protéolytiques et que je faisais agir sur le gluten de la farine de froment. Les résultats obtenus correspondaient à ceux de Kjeldahl. Il y avait, pourtant, comme dans les essais de celui-ci, souvent, entre les déterminations parallèles, des écarts trop grands et qu'il serait désirable d'éviter.

De plus, la dissolution du gluten employé n'était pas complète. La solution n'était jamais toute limpide. En laissant reposer, un précipité (de l'amidon, peut-être aussi des composés azotés) se formait toujours. Elle coagulait sous l'action de l'enzyme coagulante déjà nommée de l'extrait de malt — enzyme qui, d'après mes recherches, faisait aussi coaguler le lait¹⁾ — ce qui, sans doute, rendait moins nombreux les points d'attaque de l'enzyme et plus faible son action.

Pour ces raisons j'essayais de changer d'albumine, prenant celle qu'on peut extraire de la farine de froment par l'alcool à 55 p. c. et que Kjeldahl a nommée „glutine“²⁾. J'en donnerai plus loin la description détaillée avec le procédé pour l'obtenir. Ici je me borne aux caractères suivants : avec les acides faibles elle donne une solution parfaitement limpide qui ne se coagule ni à l'ébullition ni sous l'influence de la présure, tandis que, d'autre part, elle est très sensible à l'action des enzymes protéolytiques de l'extrait de malt.

Alors une nouvelle difficulté s'est produite. Avec du sulfate de cuivre + de l'hydrate de sodium + du sel de Seignette cette substance donnait un précipité extrêmement glutineux et qu'il était impossible d'éloigner du verre pour en faire le dosage. Il fallait donc trouver un autre précipitant. Après en avoir essayé plusieurs (sels de métaux lourds, acide trichloracétique, et d'autres) qui donnaient des résultats plus

¹⁾ V. Fr. Weis: Zeitschr. f. physiol. Chemie XXXI, 96 (1900).

²⁾ V. J. Kjeldahl: Forhandlingerne ved Naturforsker mødet i Kjøbenhavn 1892 ou les présents Comptes rendus V, p. X (1900).

ou moins satisfaisants, je me suis décidé, provisoirement, pour l'acide tannique. Réuni à un peu de chlorure ou d'acétate de sodium, celui-ci donnait, non pas seulement de beaux précipités, mais aussi des produits filtrés qui traversaient vite les filtres, et étaient limpides. Il précipitait toute la „glutine“ qui n'avait été soumise à aucune action, mais une partie, seulement, de celle qui avait été soumise à l'action de l'extrait de malt. Le précipité se réunissait vite sous la forme d'une masse volumineuse où le dosage de l'azote était facile à opérer.

Pour éviter un lavage, qui aurait pu redissoudre le précipité en partie, j'ai préféré d'employer, au lieu des précipités, une quote-part des liquides filtrés pour y déterminer, d'après la méthode de Kjeldahl, la quantité d'azote se dérobant à la précipitation par l'acide tannique avant et après la protéolyse. Ce procédé est, à mon avis, beaucoup plus sûr que celui qui opère sur les précipités.

Plus loin dans mon travail j'ai trouvé que le chlorure stanneux est un précipitant excellent pour l'élucidation de certaines phases de la protéolyse sur lesquelles l'acide tannique ne nous renseigne pas. Je parlerai tout-à-l'heure de la valeur et de l'emploi de ces deux substances comme précipitants. Je vais commencer par la description des méthodes employées, de beaucoup le plus souvent, à mes expériences. Le but de celles-ci, que j'indiquerai sous le nom d'expériences modèles, était de trouver les lois générales de l'action des enzymes. Je décrirai plus tard les méthodes appliquées aux cas spéciaux pour trouver certains côtés de la nature des enzymes.

Préparation des extraits de malt.

Toutes mes expériences modèles sont faites avec des extraits de malt vert arrivé au point où — au neuvième jour de germination — la germination est interrompue par la torrification à la touraille. Des expériences, dont je parlerai plus loin, ont prouvé que c'est là le moment de la vie de la plantule d'orge où on trouve ordinairement le plus grand pouvoir fermentatif protéolytique, du moins trypsique, quoiqu'il puisse y avoir d'assez grandes différences individuelles entre les différents échantillons de malt.

On prépare toujours les extraits immédiatement après qu'on aura été chercher le malt à la malterie, pour l'empêcher de se sécher à l'air. On écrase le malt en le faisant passer deux fois par un hachoir. Il se forme ainsi une bouillie épaisse, qu'on délaie avec de l'eau. Aux premières expériences je me servais d'une partie de malt pour deux d'eau, mais après, je n'ai mis que quatre parties d'eau pour trois de malt. On obtient ainsi des extraits de malt à la fois plus riches en

azote et plus actifs. La bouillie est délayée dans de l'eau, à plusieurs reprises, pendant 30 à 60 minutes, à la température ambiante. Quelquefois on l'a laissée jusqu'au lendemain dans l'armoire glacière (à 4°—5°), mais, en général, je la filtre au bout de la demi-heure ou de l'heure par un filtre plissé sur un entonnoir à nervures. On rejette sur le filtre le premier liquide filtré, répétant l'opération 3 ou 4 fois pendant un quart d'heure, jusqu'à ce qu'il passe parfaitement limpide. On place le tout dans l'armoire glacière, où le filtrage se fait avec beaucoup de lenteur, jusqu'au lendemain. Voici quelques résultats:

de 670 ^{gr}	de malt +	892 ^{cc}	d'eau on obtint	540 ^{cc}	d'extrait de malt
- 890 ^{gr}	—	+ 1187 ^{cc}	—	-	800 ^{cc} — —
- 1000 ^{gr}	—	+ 1333 ^{cc}	—	-	980 ^{cc} — —

La matière sèche du malt employé variait considérablement entre 49.35, 50.44, 53.40, 55.99 p. c. Il va de soi que la quantité d'azote varie avec les différentes orges. On verra les variations des chiffres suivants indiquant en milligrammes la quantité d'azote contenue dans 10^{cc} de différents extraits préparés de 3 parties de malt et de 4 parties d'eau:

Orge de 1898			Orge de 1900		
18.35	milligrammes	d'azote.	15.00	milligrammes	d'azote
16.66	—	—	19.62	—	—
18.37	—	—	19.21	—	—
16.35	—	—	19.66	—	—
17.21	—	—	18.88	—	—
17.70	—	—	20.04	—	—
19.33	—	—	19.10	—	—
			18.84	—	—

La différence des deux années est assez sensible, tandis que les variations de chaque année, prise à part, sont petites, à une exception près.

De même que les quantités de substance sèche et d'azote varient, on trouve des variations au pouvoir fermentatif des extraits de malt, sans qu'il soit nécessaire de supposer des relations définies entre ces caractères.

En général, on se sert des extraits de malt le lendemain de leur préparation, le jour même où s'est accompli le filtrage. Mais, du reste, ils ne s'affaiblissent aucunement si on les laisse dans l'armoire glacière deux ou trois jours, ou plus longtemps encore, pourvu qu'on les garde à 0°, emballés de glace dans un sseau. Aussi, au cas qu'on désire se servir du même extrait pour la comparaison de plus de séries d'expériences qu'on ne peut faire en un jour, a-t-on recours, ordinaire-

ment, à cet emballage de glace qui conserve le pouvoir fermentatif sans affaiblissement pendant près de 8 jours, l'extrait restant frais et limpide tout le temps. — Si, au contraire, on laisse les extraits sans emballage de glace dans l'armoire glacière à 4^0-5^0 , il se produit, au bout de 3—4 jours, une fermentation acide très forte. Les extraits se troublent, prennent une odeur fétide, finissant par perdre leur pouvoir fermentatif protéolytique. Ainsi qu'il résulte d'expériences décrites plus loin, celui-ci pourra, presque sans affaiblissement, se conserver assez longtemps, de 8 à 10 jours, en ajoutant du toluol. Mais je ne me suis servi de ce préservatif qu'exceptionnellement. L'addition de thymol, de chloroforme, d'aldéhyde formique est impraticable à cause de l'influence nuisible qu'exercent sur les enzymes ces matières (v. plus loin III, 8).

Mesure du pouvoir fermentatif.

Pour suivre la protéolyse, on pourrait soumettre à l'autodigestion l'extrait de malt, qui contient toujours des substances protéiques se laissant modifier ultérieurement par les enzymes protéolytiques. Mais on n'obtient ainsi que des traits peu considérables, quoiqu'un peu plus grands en acidulant l'extrait. En effet, les matières protéiques de l'orge ont déjà été soumises à une protéolyse fermentative pendant la germination, et il n'en reste, au malt vert, qu'une petite quantité à même d'être ultérieurement dédoublée. De tels essais ont été faits en grand nombre, mais surtout à titre de comparaison et de contrôle. — On pourrait aussi faire agir les enzymes, par macération, sur les matières protéiques insolubles à l'eau avec lesquelles elles se trouvent au grain. J'ai fait un assez grand nombre d'essais de ce genre, surtout avec du malt touraillé. Mais on n'obtient ainsi aucun chiffre absolu indiquant l'action fermentative. On trouve bien un changement au rapport pour cent de l'azote resté intact à l'azote dédoublé, mais il n'est pas toujours facile de déterminer l'influence exercée sur ce rapport par les conditions d'extraction.

Si, au contraire, on soumet une substance albuminoïde, pure autant que possible, à la protéolyse par l'action d'un extrait de malt, on pourra exprimer le dédoublement en chiffres absolus, quand même il ne suffit pas d'en faire la simple lecture pour déterminer la loi de l'influence d'un agent, puisqu'on ne peut pas empêcher le changement d'autres agents pendant les expériences.

C'est de cette méthode que je me suis servi pour la plupart de mes expériences en employant la *glutine* de Kjeldahl, l'albumine

soluble dans l'alcool à 55 p. c. et dont j'ai parlé plus haut. Voici comment je l'obtiens¹⁾: On délaie soigneusement de la farine de froment, première qualité, par petites portions dans deux fois son poids d'alcool à 55 p. c. On refroidit à 8°. Au bout de quelque temps on porte la masse sur des filtres Chardin qu'on couvre avec une plaque de verre. Le filtrage se fait très lentement, demandant 3—4 jours. On met le liquide filtré faiblement opalisant et jaunâtre dans un mélange réfrigérant pendant 24 heures. On décante ce qui, pour n'être pas congelé, ne s'est pas réuni au fond sous la forme d'un sirop visqueux. On redissout le sirop dans un petit peu d'alcool à 55 p. c. On continue de refroidir et de redissoudre jusqu'à ce qu'on pense avoir obtenu un produit suffisamment pur. Redissous dans le moins d'alcool à 55 p. c. possible, celui-ci se précipite comme un précipité blanc brillant, si on verse la solution goutte à goutte ou comme un filet mince, dans une grande partie d'alcool absolu. Laissez là-dessous pendant quelque temps, la glutine finit par s'endurcir formant une masse cassante qu'on pulvérise avec un peu d'alcool absolu; on en sépare celui-ci par filtration sur un appareil de Büchner. On lave à l'alcool absolu. Enfin, on fait sécher dans le vide sur de l'acide sulfurique, à la température ordinaire, pendant plusieurs jours. On obtient ainsi une poudre légère et blanche; mais la quantité n'en est que très petite vu la quantité de farine employée (v. le tableau p. 154).

Le plus naturel aurait été, sans doute, de se servir d'une albumine tirée de l'orge ou du malt. Voici, cependant, pour quelles raisons j'ai préféré celle du froment. D'une part, on obtient, par le procédé que je viens de décrire, une quantité beaucoup plus petite d'orge et de malt, et des produits moins purs. Après 6—7 congélations j'ai obtenu, de la farine de malt, un produit qui donnaient des solutions pas toutes claires, d'un jaune sale, opalisantes. Comme j'avais besoin, pour le grand nombre d'essais que je devais faire, de quantités d'albumine considérables, ces faits étaient de grande importance. D'autre part, l'action de l'extrait de malt était beaucoup plus forte sur ma préparation de froment que sur mes préparations d'orge et de malt. Aussi celle-là donnait-elle des traits plus forts de l'action des différents agents, ainsi qu'il résultera des expériences communiquées plus loin. Ici je me bornerai à montrer la quantité de matière obtenue des différentes portions de farine employées.

¹⁾ Kjeldahl indique brièvement la méthode dans sa communication au Congrès des Naturalistes de Copenhague, 1892. Voir aussi les présents Comptes rendus, V p. XI (1900).

en grammes	nombre de congélations	glutine obtenue en grammes	
2375 farine de froment	5	35	= 1.47 pour cent
5000 — — —	2	127	= 2.54 —
5000 — — —	2	170	= 3.40 —
2500 — — —	2	61	= 2.44 —
3000 — — —	2	102	= 3.40 —
4000 — — —	3	141.5	= 3.56 —
2000 farine d'orge...	2	28.2	= 1.41 —
2000 farine de malt .. 6—7		8.4	= 0.42 —

Il faut observer que les oscillations des rendements dépendent non seulement du nombre des congélations, mais aussi de la teneur en eau plus ou moins grande de la farine, de la richesse en azote des céréales, etc.

Kjeldahl appelle, nous venons de le dire, glutine (v. p. 152) l'albumine obtenue ainsi. Il en donne quelques-unes des propriétés caractéristiques, que je suis à même de suppléer de quelques observations nouvelles. En effet, souvent forcé, en variant les conditions de mes expériences, d'examiner la manière de se comporter de cette substance, je me renseignais, à l'occasion, sur ses propriétés physiques et chimiques.

Quant à sa solubilité, cette albumine est insoluble dans l'eau et dans l'alcool au-dessus de 90 p. c., soluble dans l'alcool de force moyenne et dans les alcalis (hydrate de sodium, carbonate neutre de sodium) de concentrations pas trop faibles. Elle se comporte différemment vis-à-vis des acides organiques et des acides minéraux. Pour les premiers, on a examiné ses rapports à l'acide lactique et à l'acide acétique. Les concentrations les plus faibles dans lesquelles 2 p. c. de la préparation se dissolvent entièrement, sont l'acide lactique étendu à 0.05 p. c. (= l'acide titré normal au $\frac{1}{180}$) et l'acide acétique étendu à 0.03 p. c. (= l'acide titré normal au $\frac{1}{300}$), mais la solubilité va en augmentant avec la concentration des acides, du moins jusqu'à l'acide lactique étendu à 4 p. c. et à l'acide acétique étendu à 6 p. c., les concentrations les plus fortes examinées de ces acides. Dans l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique, au contraire, elle n'est soluble qu'au-dedans de limites très étroites. En faisant bouillir, on est à même de dissoudre entièrement 2 p. c. de la préparation dans des concentrations d'acide sulfurique variant entre l'acide titré normal au $\frac{1}{400}$ et au $\frac{1}{10}$. Mais en refroidissant jusqu'à la température ordinaire, une partie se dépose de nouveau si les concentrations sont plus faibles que la liqueur acide normale au $\frac{1}{300}$ ou plus fortes que celle au $\frac{1}{40}$. La solution reste limpide dans les concentrations intermédiaires sauf la solution dans une liqueur titrée normale au $\frac{1}{50}$, qui devient opalisante. Il faut considérer que la sub-

stance est insoluble dans l'acide sulfurique d'une concentration au-dessus de 0.49 p. c. (= une liqueur titrée normale au $1/10$), le maximum de solubilité se trouvant autour d'une concentration de 0.049 p. c. (= une liqueur titrée normale au $1/100$). Il en est, en réalité, de même de l'acide chlorhydrique, à cela près que la solubilité est généralement un peu plus grande.

Ces solutions supportent l'ébullition sans coagulation de l'albumine. Une solution dans l'acide lactique à 0.4 p. c. — c'est l'acide dont je me suis servi le plus souvent — se conserve extrêmement bien, surtout si on la laisse à une température basse (4° — 5°). Si une partie de l'eau s'évapore, une masse gélatineuse et transparente finit par se déposer.

Le pouvoir rotatoire de la glutine a été étudié par Kjeldahl. Il l'a trouvé:

dans l'alcool à 55 p. c	pour $\alpha_D = + 92^{\circ}$
— le vinaigre glacial	— - = $+ 81^{\circ}$
— l'acide acétique à 0,1—5 p. c.	— - = $+ 111^{\circ}$
— le phénol à 40°	— - = $+ 130^{\circ}$

Kjeldahl fait remarquer que le chiffre qu'il a trouvé pour le pouvoir rotatoire — en tout cas en solution alcoolique — est tellement constant qu'il l'a trouvé le même dans des préparations de froment des climats les plus divers (froment de Danube, froments californien et danois) et de quatre années différentes.

Il trouva la même stabilité à la quantité d'azote, qui ne déviait jamais beaucoup de 17.25 p. c. Dans deux préparations, que j'ai examinées à cet égard, j'ai trouvé 17.18 et 17.22 p. c. d'azote, ce qui paraît s'accorder assez bien avec les chiffres de Kjeldahl.

On précipite la glutine complètement (v. le tableau p. 158) par certains précipitants, l'acide tannique, par exemple, additionné d'un peu de solution saline (acétate de sodium ou chlorure de sodium). On en précipite environ 98 p. c. (97.9 p. c.) par une solution de sulfate de zinc. De deux préparations on a précipité 94.9 et 95.6 p. c. respectivement de la quantité totale d'azote par le chlorure stanneux additionné de chlorure de calcium. L'action de l'acide lactique ne change en rien ces réactions. M. Schjerning, chef de laboratoire de Ny Carlsberg, ayant eu un petit échantillon d'une de mes préparations, en a étudié les réactions avec des précipitants dont il a l'habitude de se servir. Il a bien voulu me communiquer les chiffres suivants, qui expriment la quantité d'azote total précipitée en deux dosages parallèles:

	I	II
Par du chlorure stanneux	94.7 p. c.	et 92.7 p. c.
- du chlorure mercurique	96.1 —	- 94.8 —
- de l'acétate de fer + du phosphate disodique	55.3 —	- , —

	I	II
Par de l'acétate de fer + du phosphate acide de calcium „ p. c. et 64.6 p. c.		
- de l'acétate uranique	94.7 —	- 94.8 —
- du sulfate de magnésium	96.1 —	- 96.8 —
erreur admissible	1.4 —	- 1.1 —

Peut-être a-t-on ici, contrairement à ce que pensait Kjeldahl, un mélange de deux ou de plusieurs corps. Ce qui semble l'indiquer, c'est qu'aucun des précipitants appliqués ne donne, comme le fait l'acide tannique, une précipitation complète. Il n'y a pas lieu, cependant, de discuter ici cette question, d'autant plus qu'en choisissant cette substance ce n'est pas un corps absolument pur — un individu chimique — que j'ai cherché. Ce qui m'a guidé, ce sont les considérations que voici: 1° ce corps est-il susceptible de l'action de l'extrait de malt? 2° donne-t-il des précipitations bien prononcées et qui permettent de suivre la protéolyse quantitativement? Sous ces deux rapports son action a été toute satisfaisante¹⁾.

Enfin j'ajouterai²⁾ qu'en faisant bouillir ce corps avec de l'acide chlorhydrique à 20 p. c. et de l'étain on obtient constamment de 29.4 à 29.6 p. c. d'ammoniaque, qu'on ait étendu la décomposition à quatre ou à huit fois vingt-quatre heures.

Dans son rapport fait au Congrès des Naturalistes de Copenhague, 1892, Kjeldahl, nous venons de le dire, a appelé ce corps glutine. C'est aussi de ce nom qu'il se servait tous les jours au laboratoire. Mais il n'a jamais, que je sache, donné ses raisons du choix de ce nom. Peut-être a-t-il seulement voulu le distinguer, tout court, de la vieille conception de gluten de Ritthausen, tandis que, d'autre part, on ne peut, à son avis, l'identifier avec aucune des trois matières albuminoïdes solubles dans l'alcool (fibrine, gliadine, mucéline) qu'on pense avoir trouvées plus tard dans le froment³⁾. A l'avis de Kjeldahl, il n'y a qu'une seule albumine soluble dans l'alcool, ses préparations ayant toujours donné la constante sus-dite par rapport à l'azote et au pouvoir rotatoire. Cependant, il faut se demander si les faits connus de ce corps autorisent à l'emploi d'un terme réservé jusqu'ici, dans la terminologie scientifique, aux matières collagènes. A mon avis, il ne faudrait pas, malgré certaines ressemblances avec celles-ci, étendre le terme de glutine aux matières albuminoïdes végétales, avant d'en avoir établi la nature par la détermination et l'étude soigneuses de leurs propriétés physiques

¹⁾ Ce serait un problème assez intéressant que la détermination de sa pureté, de ses dédoublements sous l'action d'acides, d'alcalis, etc., et, avant tout, de sa place parmi les matières protéiques déjà étudiées avec plus d'exactitude.

²⁾ D'après des renseignements qu'a bien voulu me fournir mon collègue M. C. Pedersen.

³⁾ Osborne & Voorhees, v. Griessmayer: Die Proteide der Getreidearten, 2 édition p. 95 (1897).

et chimiques. Quoique, dans une communication provisoire, publiée à la „Zeitschr. für physiol. Chemie“, je me sois déjà servi de ce nom en parlant de cette préparation, je préférerai, dans la suite, de l'appeler, en général, protéine et, plus particulièrement, protéine de froment, de malt, d'orge, etc., évitant ainsi d'anticiper un terme mieux approprié et qu'on pourrait trouver plus tard.

Si, à une température convenable, on fait agir un extrait de malt sur une telle solution de protéine, faiblement acide, la protéine subit une transformation — qui finit par devenir presque complète — laquelle se manifeste de différentes manières, soit en se dérobant à la précipitation par certains précipitants, soit en se faisant dialysable, soit en donnant des réactions nouvelles de coloration, soit en se dédoublant en substances toutes nouvelles et dont on peut constater la présence dans le liquide. Quelque chose de semblable arrive, mais à un degré moindre, pour un extrait de malt auquel on n'a pas ajouté de protéine, les matières albuminoïdes ayant été exposées, déjà pendant la germination, à l'action des ferments protéolytiques. Ainsi il se présente plusieurs méthodes pour suivre la protéolyse, et je me suis servi, dans des buts différents, de méthodes différentes. Dans le plus grand nombre d'expériences, cependant, j'ai eu recours, je l'ai déjà dit, aux réactions des précipitants et surtout de deux, dont je vais parler plus en détail: l'acide tannique et le chlorure stanneux.

Voici les indications qu'on trouve dans la littérature¹⁾ au sujet de l'acide tannique: il précipite complètement les albumines proprement dites (ovalbumine, caséine, lactalbumine), mais incomplètement les produits de leur dédoublement (albumoses, vraies peptones) et, parmi eux, les peptones se dissolvent de nouveau complètement dans un excès du précipitant (Sebelien). Il y a pourtant, à cette précipitation, plusieurs circonstances secondaires à observer: les substances albuminoïdes qui ne contiennent pas de parties minérales ne se précipitent pas complètement, à moins d'ajouter un sel en petite quantité (chlorure de sodium, acétate de sodium, chlorure de calcium, sulfate de magnésium, etc.); la précipitation doit se faire à froid; le degré de dilution et la quantité du précipitant exercent de l'influence, etc. Puis le dissolvant de l'acide tannique n'est pas indifférent. Sebelien indique une solution spiritueuse d'après le récépé d'Almén²⁾ (4^{er} de tannin, 8^{cc} d'acide acétique à 25 p. c., et 190^{cc} d'alcool de 40—50 p. c.). Pour moi, je me suis toujours servi d'une solution aqueuse à 5 p. c.

¹⁾ V., par exemple, Sebelien: Studier over Æggehvidestoffernes analytiske Bestemmelse med særligt Hensyn til Mælk. Videnskabernes Selskabs Oversigt 1888, 81—126 et Zeitschr. für physiol. Chemie XIII, 135—180 (1889).

²⁾ Almén: Upsala läkareföreningens förhandlingar 1870.

	I	II
Par de l'acétate de fer + du phosphate acide de calcium	p. c. et 64.6 p. c.	
- de l'acétate uranique	94.7 —	- 94.8 —
- du sulfate de magnésium	96.1 —	- 96.8 —
erreur admissible	1.4 —	- 1.1 —

Peut-être a-t-on ici, contrairement à ce que pensait Kjeldahl, un mélange de deux ou de plusieurs corps. Ce qui semble l'indiquer, c'est qu'aucun des précipitants appliqués ne donne, comme le fait l'acide tannique, une précipitation complète. Il n'y a pas lieu, cependant, de discuter ici cette question, d'autant plus qu'en choisissant cette substance ce n'est pas un corps absolument pur — un individu chimique — que j'ai cherché. Ce qui m'a guidé, ce sont les considérations que voici: 1° ce corps est-il susceptible de l'action de l'extrait de malt? 2° donne-t-il des précipitations bien prononcées et qui permettent de suivre la protéolyse quantitativement? Sous ces deux rapports son action a été toute satisfaisante¹⁾.

Enfin j'ajouterai²⁾ qu'en faisant bouillir ce corps avec de l'acide chlorhydrique à 20 p. c. et de l'étain on obtient constamment de 29.4 à 29.6 p. c. d'ammoniaque, qu'on ait étendu la décomposition à quatre ou à huit fois vingt-quatre heures.

Dans son rapport fait au Congrès des Naturalistes de Copenhague, 1892, Kjeldahl, nous venons de le dire, a appelé ce corps glutine. C'est aussi de ce nom qu'il se servait tous les jours au laboratoire. Mais il n'a jamais, que je sache, donné ses raisons du choix de ce nom. Peut-être a-t-il seulement voulu le distinguer, tout court, de la vieille conception de gluten de Ritthausen, tandis que, d'autre part, on ne peut, à son avis, l'identifier avec aucune des trois matières albuminoïdes solubles dans l'alcool (fibrine, gliadine, mucédine) qu'on pense avoir trouvées plus tard dans le froment³⁾. A l'avis de Kjeldahl, il n'y a qu'une seule albumine soluble dans l'alcool, ses préparations ayant toujours donné la constante sus-dite par rapport à l'azote et au pouvoir rotatoire. Cependant, il faut se demander si les faits connus de ce corps autorisent à l'emploi d'un terme réservé jusqu'ici, dans la terminologie scientifique, aux matières collagènes. A mon avis, il ne faudrait pas, malgré certaines ressemblances avec celles-ci, étendre le terme de glutine aux matières albuminoïdes végétales, avant d'en avoir établi la nature par la détermination et l'étude soigneuses de leurs propriétés physiques

¹⁾ Ce serait un problème assez intéressant que la détermination de sa pureté, de ses dédoublements sous l'action d'acides, d'alcalis, etc., et, avant tout, de sa place parmi les matières protéiques déjà étudiées avec plus d'exactitude.

²⁾ D'après des renseignements qu'a bien voulu me fournir mon collègue M. C. Pedersen.

³⁾ Osborne & Voorhees, v. Griessmayer: Die Proteide der Getreidearten, 2 édition p. 95 (1897).

et chimiques. Quoique, dans une communication provisoire, publiée à la „Zeitschr. für physiol. Chemie“, je me sois déjà servi de ce nom en parlant de cette préparation, je préférerai, dans la suite, de l'appeler, en général, protéine et, plus particulièrement, protéine de froment, de malt, d'orge, etc., évitant ainsi d'anticiper un terme mieux approprié et qu'on pourrait trouver plus tard.

Si, à une température convenable, on fait agir un extrait de malt sur une telle solution de protéine, faiblement acide, la protéine subit une transformation — qui finit par devenir presque complète — laquelle se manifeste de différentes manières, soit en se dérochant à la précipitation par certains précipitants, soit en se faisant dialysable, soit en donnant des réactions nouvelles de coloration, soit en se dédoublant en substances toutes nouvelles et dont on peut constater la présence dans le liquide. Quelque chose de semblable arrive, mais à un degré moindre, pour un extrait de malt auquel on n'a pas ajouté de protéine, les matières albuminoïdes ayant été exposées, déjà pendant la germination, à l'action des ferments protéolytiques. Ainsi il se présente plusieurs méthodes pour suivre la protéolyse, et je me suis servi, dans des buts différents, de méthodes différentes. Dans le plus grand nombre d'expériences, cependant, j'ai eu recours, je l'ai déjà dit, aux réactions des précipitants et surtout de deux, dont je vais parler plus en détail: l'acide tannique et le chlorure stanneux.

Voici les indications qu'on trouve dans la littérature¹⁾ au sujet de l'acide tannique: il précipite complètement les albumines proprement dites (ovalbumine, caséine, lactalbumine), mais incomplètement les produits de leur dédoublement (albumoses, vraies peptones) et, parmi eux, les peptones se dissolvent de nouveau complètement dans un excès du précipitant (Sebelien). Il y a pourtant, à cette précipitation, plusieurs circonstances secondaires à observer: les substances albuminoïdes qui ne contiennent pas de parties minérales ne se précipitent pas complètement, à moins d'ajouter un sel en petite quantité (chlorure de sodium, acétate de sodium, chlorure de calcium, sulfate de magnésium, etc.); la précipitation doit se faire à froid; le degré de dilution et la quantité du précipitant exercent de l'influence, etc. Puis le dissolvant de l'acide tannique n'est pas indifférent. Sebelien indique une solution spiritueuse d'après le récépé d'Almén²⁾ (4^{er} de tannin, 8^{ec} d'acide acétique à 25 p. c., et 190^{ec} d'alcool de 40—50 p. c.). Pour moi, je me suis toujours servi d'une solution aqueuse à 5 p. c.

¹⁾ V., par exemple, Sebelien: Studier over Æggehvidestoffernes analytiske Bestemmelse med særligt Hensyn til Mælk. Videnskabernes Selskabs Oversigter 1888, 81—126 et Zeitschr. für physiol. Chemie XIII, 135—180 (1889).

²⁾ Almén: Upsala läkareföreningens förhandlingar 1870.

Expériences	Solution de proto- ténine à 2 p. 100	Extrait de malt	Solution d'acé- tate de sodium	Solution d'acide tannique	Apparence du liquide après la pré- cipitation	Dosage d'azote du liquide filtré			Apparence du liquide filtré
						Réceptif à H ² SO ⁴ titre normal au 1/10	titre par l'hypo- sul- fite	Az en milligr.	
No.	cc	cc	gouttes	cc		cc	cc		
294	10	0	0	10	le liquide ne se laisse pas filtrer	10	"	"	très troublée } précipité abondant par l'addition d'un surplus d'acide tannique
295	—	—	6	1		—	12.21	14.80	
296	—	—	—	2	liquide sus- pendu très troublé	—	15.90	7.42	troublée } faiblement troublée. Filtration lente. Plus de précipité par l'addition d'acide tannique
297	—	—	—	3		—	19.31	0.60	
298	—	—	—	4	liquide faiblement opalisant	—	19.58	0.06	claire
299	—	—	3	5		—	19.58	0.06	
300	—	—	—	6	liquide faiblement opalisant	—	19.60	0.02	—
301	—	—	—	7		—	19.60	0.02	
302	—	—	—	8	liquide clair	—	19.56	0.10	pas de précipité par l'addition d'un surplus d'acide tannique
303	—	—	—	9		—	19.62	+0.02	
304	—	—	—	10	liquide clair, jaune	—	19.60	0.02	—
305	—	—	—	20		—	19.58	0.06	
306	—	—	—	30	liquide suspen- du encore plus troublé qu'en 295—298	—	19.58	0.06	troublée } précipité abondant par l'acide tannique
307	—	10	0	1		—	8 40	22.42	
308	—	—	—	2	liquide par- faitement clair. Tous essais pareils	—	12 97	14.48	faiblement troublée } très troublée par l'acide tannique
309	—	—	—	3		—	13.5	12.06	
310	—	—	—	4	liquide par- faitement clair. Tous essais pareils	—	14.44	10.34	—
311	—	—	—	5		—	14.56	10.10	
312	—	—	—	6	liquide par- faitement clair. Tous essais pareils	—	14.60	10.02	—
313	—	—	—	7		—	14.60	10.02	
314	—	—	—	8	liquide par- faitement clair. Tous essais pareils	—	14.60	10.02	— non troublée par l'acide tann.
315	—	—	—	9		—	14.58	10.06	
316	—	—	—	10	liquide par- faitement clair. Tous essais pareils	—	14.65	9.92	—
317	—	—	—	20		—	14.68	9.86	
318	—	—	—	30	liquide par- faitement clair. Tous essais pareils	—	14.70	9.82	—
319	—	50	—	30		(39.41)			
320	0	10	—	10	opalisant, opaque	20	15.36	48.10	titre de 20 ^{cc} H ² SO ⁴
321	10	0	3	30		10	14.62	9.98	
322	12 ^{cc}	d'acide sulfur. conc.	—	—	cinq jours de repos. Filtration	10	19.58	0.06	—
323	—	—	—	—		—	19.62		
essais de contrôle						10	19.60	19 ^{cc} .61	de solution d'hypo- sulfité normale au 1/10
						—	19.62		

Comme il était de la plus grande importance de connaître l'action de ce précipitant sur l'extrait de malt et sur ma préparation de protéine, j'ai fait un grand nombre d'essais à ce sujet.

A cet effet, j'ai employé un extrait de malt préparé de 700^{gr} de malt vert écrasé + 900^{cc} d'eau distillée (faisant 650^{cc} d'extrait), une solution de protéine à 2 p. c. dans de l'acide lactique aqueux à 0.4 p. c. et une solution d'acide tannique à 5 p. c. J'examine d'abord l'influence de l'addition de quelques gouttes d'une solution d'acétate de sodium à 5 p. c. pour apprendre si la précipitation est totale. On voit alors que, dans l'extrait de malt, la précipitation s'opère mieux sans addition qu'avec addition d'acétate de sodium, celui-ci empêchant plutôt le précipité de se déposer aussi rapidement qu'il fait sans la présence de l'acétate. En effet, l'extrait de malt contient un grand nombre de sels minéraux; il est donc superflu d'en ajouter encore. Dans une solution pure de protéine, au contraire, l'addition d'un petit peu d'acétate de sodium est de la plus grande importance pour obtenir une précipitation complète et un liquide filtré clair, tandis qu'elle n'est pas nécessaire dans un mélange d'extrait de malt et de solution de protéine. Les essais inscrits au tableau ci-contre doivent nous renseigner sur les points suivants: 1° quelle est la quantité d'acide tannique nécessaire pour précipiter d'une quantité déterminée d'extrait de malt ou de solution de protéine toute la matière précipitable? 2° l'excès d'acide tannique redissout-il une partie du précipité?

La précipitation se fait dans des fioles jaugées, en remplissant plus tard d'eau distillée. La filtration ne se fait que le lendemain. Pour doser l'azote d'après la méthode de Kjeldahl, on emploie 50^{cc} du liquide filtré. (Pour les détails v. p. 163):

Si, aux essais où on a employé 10^{cc} d'extrait de malt, la teneur en azote des liquides filtrés ne descend pas notablement au-dessous de 10^{ms} c'est que l'extrait de malt contient des matières azotées (bases hexoniques, corps amidés, ammoniacque, etc.), produites, probablement, par l'action des enzymes dans le grain en germination, et lesquelles se dérobent à la précipitation par l'acide tannique. Ordinairement ces matières constituent la moitié de l'azote total. Aucun dosage d'azote n'a été fait pour l'extrait de malt en question ici. Mais voici, à titre de comparaison, quelques chiffres pris à d'autres expériences: en 10^{cc} de différents extraits de malt on trouve:

Az total	Az du liquide filtré de la précipitation per l'acide tannique	
	quantité trouvée	quantité pour 100 d'azote total
18.35 milligrammes	8.57 milligrammes	46.7
18.37 —	8.61 —	46.3

Expériences	Solution de protéine à 2 p. 100	Extrait de malt	Solution d'acétate de sodium	Solution d'acide tannique	Apparence du liquide après la précipitation	Dosage d'azote du liquide filtré			Apparence du liquide filtré
						Réceptif à H ⁺ SO ⁴ titré normal au 1/7	titre par l'hyposulfite	Az en milligr.	
No.	cc	cc	gouttes	cc		cc	cc		
294	10	0	0	10	{ le liquide ne se laisse pas filtrer	10	"	"	
295	—	—	6	1		—	12.21	14.80	{ très troublée } précipité abondant par l'addition d'un surplus d'acide tannique
296	—	—	—	2	{ liquide suspendu très troublé	—	15.90	7.42	
297	—	—	—	3		—	19.31	0.60	{ faiblement troublée. Filtration lente. Plus de précipité par l'addition d'acide tannique
298	—	—	—	4		—	19.58	0.06	
299	—	—	3	5	{ liquide faiblement opalisant	—	19.58	0.06	claire
300	—	—	—	6		—	19.60	0.02	—
301	—	—	—	7		—	19.60	0.02	—
302	—	—	—	8		—	19.56	0.10	{ pas de précipité par l'addition d'un surplus d'acide tannique
303	—	—	—	9	{ liquide clair	—	19.62	+0.02	
304	—	—	—	10		—	19.60	0.02	
305	—	—	—	20	{ liquide clair, jaune	—	19.58	0.06	
306	—	—	—	30		—	19.58	0.06	—
307	—	10	0	1	{ liquide suspendu encore plus troublé qu'en 295-298	—	8.40	22.42	troublée
308	—	—	—	2		—	12.97	14.48	{ faiblement troublée } précipité abondant par l'acide tannique
309	—	—	—	3		—	13.5	12.06	
310	—	—	—	4	{ liquide parfaitement clair. Tous essais pareils	—	14.44	10.34	claire
311	—	—	—	5		—	14.56	10.10	{ très troublée par l'acide tannique
312	—	—	—	6		—	14.60	10.02	
313	—	—	—	7		—	14.60	10.02	{ opalisante, mais de moins en moins, par l'acide tannique
314	—	—	—	8	{ Tous essais pareils	—	14.60	10.02	
315	—	—	—	9		—	14.58	10.06	— non troublée par l'acide tann.
316	—	—	—	10		—	14.65	9.92	—
317	—	—	—	20		—	14.68	9.86	—
318	—	—	—	30	{ opalisant, opaque	—	14.70	9.82	—
319	—	50	—	30		(39.41)			titre de 20 ^{cc} H ⁺ SO ⁴
320	0	10	—	10		20	15.36	48.10	—
321	10	0	3	30		10	14.62	9.98	—
322	12 ^{cc}	d'acide sulfur. conc.			{ cinq jours de repos. Filtration	10	19.58	0.06	—
323	—	—	—	—		10	19.62		—
322	12 ^{cc}	d'acide sulfur. conc.			{ essais de contrôle	10	19.60	19 ^{cc} .61	de solution d'hyposulfite normale au 1/14
323	—	—	—	—		—	19.62		

Comme il était de la plus grande importance de connaître l'action de ce précipitant sur l'extrait de malt et sur ma préparation de protéine, j'ai fait un grand nombre d'essais à ce sujet.

A cet effet, j'ai employé un extrait de malt préparé de 700^{gr} de malt vert écrasé + 900^{cc} d'eau distillée (faisant 650^{cc} d'extrait), une solution de protéine à 2 p. c. dans de l'acide lactique aqueux à 0.4 p. c. et une solution d'acide tannique à 5 p. c. J'examine d'abord l'influence de l'addition de quelques gouttes d'une solution d'acétate de sodium à 5 p. c. pour apprendre si la précipitation est totale. On voit alors que, dans l'extrait de malt, la précipitation s'opère mieux sans addition qu'avec addition d'acétate de sodium, celui-ci empêchant plutôt le précipité de se déposer aussi rapidement qu'il fait sans la présence de l'acétate. En effet, l'extrait de malt contient un grand nombre de sels minéraux; il est donc superflu d'en ajouter encore. Dans une solution pure de protéine, au contraire, l'addition d'un petit peu d'acétate de sodium est de la plus grande importance pour obtenir une précipitation complète et un liquide filtré clair, tandis qu'elle n'est pas nécessaire dans un mélange d'extrait de malt et de solution de protéine. Les essais inscrits au tableau ci-contre doivent nous renseigner sur les points suivants: 1° quelle est la quantité d'acide tannique nécessaire pour précipiter d'une quantité déterminée d'extrait de malt ou de solution de protéine toute la matière précipitable? 2° l'excès d'acide tannique redissout-il une partie du précipité?

La précipitation se fait dans des fioles jaugées, en remplissant plus tard d'eau distillée. La filtration ne se fait que le lendemain. Pour doser l'azote d'après la méthode de Kjeldahl, on emploie 50^{cc} du liquide filtré. (Pour les détails v. p. 163):

Si, aux essais où on a employé 10^{cc} d'extrait de malt, la teneur en azote des liquides filtrés ne descend pas notablement au-dessous de 10^{mg} c'est que l'extrait de malt contient des matières azotées (bases hexoniques, corps amidés, ammoniacque, etc.), produites, probablement, par l'action des enzymes dans le grain en germination, et lesquelles se dérobent à la précipitation par l'acide tannique. Ordinairement ces matières constituent la moitié de l'azote total. Aucun dosage d'azote n'a été fait pour l'extrait de malt en question ici. Mais voici, à titre de comparaison, quelques chiffres pris à d'autres expériences: en 10^{cc} de différents extraits de malt on trouve:

Az total	Az du liquide filtré de la précipitation par l'acide tannique	
	quantité trouvée	quantité pour 100 d'azote total
18.35 milligrammes	8.57 milligrammes	46.7
18.37 —	8.61 —	46.3

Az total		Az du liquide filtré de la précipitation par l'acide tannique		quantité pour 100 d'azote total
	quantité trouvée			
16.35	milligrammes	7.47	milligrammes	45.1
17.70	—	8.80	—	49.7
17.21	—	7.65	—	44.5
19.33	—	9.73	—	45.2
18.88	—	9.98	—	52.9
20.04	—	10.00	—	49.9
18.84	—	8.68	—	46.1
19.33	—	10.15	—	52.5
18.20	—	8.20	—	45.1
18.46	—	9.50	—	51.6
21.04	—	10.00	—	48.0

Voici les résultats de ces essais: 1° Pour la précipitation totale de 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c. il faut 3^{cc}—4^{cc} d'une solution d'acide tannique à 5 p. c. + quelques gouttes d'une solution d'acétate de sodium à 5 p. c. 2° La précipitation totale d'un mélange de 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c. et de 10^{cc} d'extrait de malt tout frais (préparé de 3 parties de malt et de 4 parties d'eau) demande 4^{cc}—5^{cc} d'acide tannique en solution à 5 p. c. 3° L'apparence troublée ou opalisante du liquide suspendu indique une précipitation incomplète, sans qu'un liquide filtré clair soit le criterium d'une précipitation totale (expériences 309—310). 4° L'excès d'acide tannique jusqu'à 30^{cc} ne redissout pas le précipité déposé, pas même au bout de cinq jours de repos. — Aussi plus tard, aux expériences modèles, employait-on toujours 10^{cc} d'acide tannique pour la précipitation de 10^{cc} de solution de protéine + 10^{cc} d'extrait de malt.

Toutes les précipitations en question sont faites à la température ordinaire du laboratoire. Mais en faisant des expériences à des températures plus élevées, on ne peut ne pas se demander si on peut interrompre ces expériences simplement en ajoutant le précipitant, ou s'il faut recourir à un refroidissement préalable. A ce sujet on a fait les essais suivants:

On employait 10^{cc} de la solution de protéine (à 2 p. c.), de l'extrait de malt et de la solution d'acide tannique (à 5 p. c.) respectivement. Avant de les mélanger, on chauffe ou on refroidit les parties à la température de la précipitation. On laisse les parties 10 minutes encore à cette température avant de diluer par de l'eau (à la température ordinaire). A toutes les températures on fait des déterminations doubles:

Expé- riences	Tempé- rature	Titre	Moyenne	Az du filtrat	Remarques
Contrôle	(10 ^{cc} de H ⁺ SO ⁴ concentré	{19.60} {19.62}	19.61		
324 325	} 2°	{14.28} {14.44}	14.36	10.50 ^{mg}	{ à 2° l'acide tannique se fait laiteux, mais il reprend sa limpidité en se redissolvant si on tient la fiole quelques instants entre les mains.
326 327	} 9°	{14.30} {14.28}	14.29	10.64 ^{mg}	
328 329	} 18°	{14.26} {14.23}	14.25	10.72 ^{mg}	
330 331	} 25°	{14.30} {14.26}	14.28	10.66 ^{mg}	
332 333	} 47°	{14.04} {14.00}	14.02	11.38 ^{mg}	
334 335	} 100°	{10.63} {12.95}	11.79	15.64 ^{mg}	{ le liquide suspendu était une émulsion laiteuse

Voici ce que nous apprennent ces expériences: 1° la précipitation est la même aux températures entre 2° et 25°; 2° elle est incomplète à 47° et à 100°; 3° si on fait la précipitation à une température élevée elle reste incomplète, quand même on refroidit à une température plus basse — résultat auquel arrive aussi Sebelien¹⁾.

Il est donc de la plus haute importance de ne pas précipiter par l'acide tannique à une température trop élevée. Aussi à tous les essais suivants ai-je refroidi les fioles en les portant sous la fontaine avant d'ajouter l'acide tannique.

Une tout autre phase de la protéolyse se révèle en employant le chlorure stanneux, l'autre précipitant dont je me suis souvent servi. Ce n'est qu'assez tard que mon attention a été attirée sur l'avantage que présente, pour mon but, l'emploi de cette substance. En me servant de ce précipitant, j'ai essayé de déterminer l'influence de différents agents d'un intérêt général sur cette autre phase.

C'est en m'efforçant de trouver les caractères qualitatifs de la protéolyse au moyen de précipitants différents que j'ai rencontré le chlorure stanneux, qui était parmi des précipitants de protéine qu'avait

¹⁾ l. c. p. 90.

Az total		Az du liquide filtré de la précipitation par l'acide tannique		
		quantité trouvée		quantité pour 100 d'azote total
16.35	milligrammes	7.47	milligrammes	45.1
17.70	—	8.80	—	49.7
17.21	—	7.65	—	44.5
19.33	—	9.73	—	45.2
18.88	—	9.98	—	52.9
20.04	—	10.00	—	49.9
18.84	—	8.68	—	46.1
19.33	—	10.15	—	52.5
18.20	—	8.20	—	45.1
18.46	—	9.50	—	51.6
21.04	—	10.00	—	48.0

Voici les résultats de ces essais: 1° Pour la précipitation totale de 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c. il faut 3^{cc}—4^{cc} d'une solution d'acide tannique à 5 p. c. + quelques gouttes d'une solution d'acétate de sodium à 5 p. c. 2° La précipitation totale d'un mélange de 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c. et de 10^{cc} d'extrait de malt tout frais (préparé de 3 parties de malt et de 4 parties d'eau) demande 4^{cc}—5^{cc} d'acide tannique en solution à 5 p. c. 3° L'apparence troublée ou opalisante du liquide suspendu indique une précipitation incomplète, sans qu'un liquide filtré clair soit le criterium d'une précipitation totale (expériences 309—310). 4° L'excès d'acide tannique jusqu'à 30^{cc} ne redissout pas le précipité déposé, pas même au bout de cinq jours de repos. — Aussi plus tard, aux expériences modèles, employait-on toujours 10^{cc} d'acide tannique pour la précipitation de 10^{cc} de solution de protéine + 10^{cc} d'extrait de malt.

Toutes les précipitations en question sont faites à la température ordinaire du laboratoire. Mais en faisant des expériences à des températures plus élevées, on ne peut ne pas se demander si on peut interrompre ces expériences simplement en ajoutant le précipitant, ou s'il faut recourir à un refroidissement préalable. A ce sujet on a fait les essais suivants:

On employait 10^{cc} de la solution de protéine (à 2 p. c.), de l'extrait de malt et de la solution d'acide tannique (à 5 p. c.) respectivement. Avant de les mélanger, on chauffe ou on refroidit les parties à la température de la précipitation. On laisse les parties 10 minutes encore à cette température avant de diluer par de l'eau (à la température ordinaire). A toutes les températures on fait des déterminations doubles:

Expé- riences	Tempé- rature	Titre	Moyenne	Az du filtrat	Remarques
Contrôle	(10 ^{cc} de H ² SO ⁴ concentré	{19.60} {19.62}	19.61		
324 325	} 2°	{14.28} {14.44}	14.36	10.50 ^{mg}	{ à 2° l'acide tannique se fait laiteux, mais il reprend sa limpidité en se redissolvant si on tient la fiole quelques instants entre les mains.
326 327	} 9°	{14.30} {14.28}	14.29	10.64 ^{mg}	
328 329	} 18°	{14.26} {14.23}	14.25	10.72 ^{mg}	
330 331	} 25°	{14.30} {14.26}	14.28	10.66 ^{mg}	
332 333	} 47°	{14.04} {14.00}	14.02	11.38 ^{mg}	
334 335	} 100°	{10.63} {12.95}	11,79	15.64 ^{mg}	{ le liquide suspendu était une émulsion laiteuse

Voici ce que nous apprennent ces expériences: 1° la précipitation est la même aux températures entre 2° et 25°; 2° elle est incomplète à 47° et à 100°; 3° si on fait la précipitation à une température élevée elle reste incomplète, quand même on refroidit à une température plus basse — résultat auquel arrive aussi Sebelien¹⁾.

Il est donc de la plus haute importance de ne pas précipiter par l'acide tannique à une température trop élevée. Aussi à tous les essais suivants ai-je refroidi les fioles en les portant sous la fontaine avant d'ajouter l'acide tannique.

Une tout autre phase de la protéolyse se révèle en employant le chlorure stanneux, l'autre précipitant dont je me suis souvent servi. Ce n'est qu'assez tard que mon attention a été attirée sur l'avantage que présente, pour mon but, l'emploi de cette substance. En me servant de ce précipitant, j'ai essayé de déterminer l'influence de différents agents d'un intérêt général sur cette autre phase.

C'est en m'efforçant de trouver les caractères qualitatifs de la protéolyse au moyen de précipitants différents que j'ai rencontré le chlorure stanneux, qui était parmi des précipitants de protéine qu'avait

¹⁾ l. c. p. 90.

recommandés Schjerning. En faisant varier soit la durée de l'expérience, soit la température, j'obtenais des courbes de précipitations de positions différentes, celle du chlorure stanneux offrant un intérêt tout particulier, ainsi qu'on verra par les résultats donnés plus loin.

D'après Schjerning¹⁾, on prépare une solution de chlorure stanneux de 50^{gr} d'étain râpé qu'on fait digérer, dans une fiole tarée, avec une forte quantité d'acide chlorhydrique concentré bouillant, jusqu'à la dissolution de tout l'étain. On évapore jusqu'à ce que le contenu de la fiole pèse 130^{gr} environ. La solution chlorhydratée de chlorure stanneux, portée à un litre en étendant d'eau distillée, est filtrée. Pour prévenir l'oxydation, on distribue la solution dans de petits flacons, qu'on remplit jusqu'aux bouchons de verre fermant hermétiquement. Ce précipitant ne précipite pas non plus les matières protéiques qui ne contiennent pas de cendres ou qui n'en contiennent que très peu. Aussi Schjerning recommande-t-il d'ajouter 5—10^{cc} d'une solution de chlorure de calcium à 10 p. c., ce que j'ai fait à toutes mes précipitations.

Nous avons déjà dit que le chlorure stanneux précipite 95 p. c. de la solution de protéine de froment. Il précipite beaucoup moins de l'azote de l'extrait de malt que ne fait l'acide tannique. Celui-ci précipite environ 50 p. c. (v. le tableau p. 158), tandis que le chlorure stanneux ne précipite qu'un peu au-delà de 30 p. c. (en deux cas 32 et 33.5 p. c.). Mais, si on précipite le mélange d'une solution de protéine et d'un extrait de malt, la quantité précipitée est moins grande que celle de deux précipitations séparées, sans qu'on en con-

	Solution de protéine à 2 p. c.	Extrait de malt	Az total	Az précipité par Sn Cl ²		
				quantité absolue	pour 100 d'Az total	
Expériences nos. 1613— 1630	cc	cc	mg	mg	pour 100	calculé trouvé
	10	"	33.68	31.96	94.9	
	"	10	19.10	6.40	33.5	
	10	10	52.78	38.36	72.7	
	10	10	52.78	36.58	69.3	
Expériences nos. 1917— 1930	10	"	31.74	30.30	95.6	calculé trouvé
	"	10	18.54	5.93	32.0	
	10	10	50.28	36.23	72.1	
	10	10	50.28	34.75	69.1	

¹⁾ V. Schjerning: Fresenius' Zeitschr. für anal. Chemie XXXIII 263 (1894), XXXIV, 135 (1895), XXXV, 285 (1896), XXXVI, 643 (1897), XXXVII, 73 (1898), XXXVII, 413 (1898), XXXIX, 545 (1900).

naïsse la cause. Le tableau suivant fera connaître les déviations dont il s'agit (v. p. 162):

A ces précipitations on employait 10^{cc} de solution de chlorure de calcium et 20^{cc} de solution de chlorure stanneux, toute la matière précipitable ne se précipitant pas par moins de 15^{cc} de chlorure stanneux. Pour éviter de trop fortes dilutions, on faisait les précipitations dans des fioles de 50^{cc}. On laissait les fioles bouchées de bouchons de liège (pour empêcher l'accès de l'oxygène) jusqu'au lendemain. Puis on filtrait. Pour obtenir un liquide filtré limpide, il fallait souvent rejeter, à plusieurs reprises, sur le filtre les premières parties filtrées. Le trouble subséquent était dû à l'oxydation du chlorure stanneux. On dosait l'azote de la moitié du liquide filtré (25^{cc}) après l'avoir évaporé avec précaution, en ajoutant un peu d'acide sulfurique concentré, à l'étuve à 100°. —

Voici quelques indications du dosage d'azote d'après Kjeldahl qui pourraient avoir de l'intérêt. On fait les dosages, nous venons de le dire, aux liquides filtrés en y prenant la moitié du volume primitif du liquide d'expérience: 50^{cc} et 25^{cc} respectivement, les fioles jaugées contenant 100^{cc} ou 50^{cc}. Avant l'évaporation on ajoute 1^{cc} environ d'acide sulfurique concentré; on évapore les solutions contenant l'acide tannique sur une flamme nue jusqu'à l'apparition de fumées d'acide sulfurique. Il n'y a pas moyen d'en faire autant avec les liquides filtrés au chlorure stanneux, l'ébullition produisant des soubresauts et des projections à l'intérieur des fioles. On met donc celles-ci à l'étuve chauffée à 100°. Si on les y laisse la nuit durant, l'évaporation sera assez avancée pour que le lendemain la décomposition par l'acide sulfurique puisse se faire sans soubresaut ni projections ni formation de mousse. Pour la décomposition on emploie, en général, 10^{cc} d'acide sulfurique concentré et une spatule d'oxyde de cuivre. Cependant l'expérience m'a bientôt appris que, pour arriver à une décomposition complète, il faut continuer l'ébullition avec l'acide sulfurique + l'oxyde de cuivre assez longtemps — 4, 5, 6 heures — même après que le liquide sera devenu clair, pour que l'oxydation subséquente par le permanganate de potassium change tout l'azote en ammoniacque. On fait la distillation et le titrage (d'acide sulfurique titré normal au $\frac{1}{7}$ sur de l'hyposulfite de sodium d'une force telle que 1^{cc} est équivalent à 1^{mg} d'azote) tout à fait de la manière indiquée par Kjeldahl¹⁾.

Expériences modèles. — Pour examiner l'influence d'un agent sur la protéolyse, il faut que tous les autres agents soient constants. Aussi, après des expériences d'orientation, ai-je choisi, pour

¹⁾ Kjeldahl: Ces Comptes-rendus II, 193 (1883).

mon procédé d'expériences, un type modèle dont j'ai déjà parlé en passant, mais que je vais maintenant définir en détail. A un tel choix, il importe de trouver les conditions les plus favorables à l'action des enzymes. En même temps, il faut trouver une mesure facile et pratique de cette action et faire le plus grand nombre possible d'essais pendant la période où une quantité variable, par exemple, le pouvoir fermentatif de l'extrait, reste assez constante. A part l'agent, que j'ai fait varier exprès ou que j'ai remplacé par un autre différent, l'expérience se fait de la manière suivante:

On emploie des volumes égaux (10^{cc}) d'un extrait de malt à 18^{mg}—20^{mg} d'azote, fraîchement préparé de 3 parties de malt vert écrasé + 4 parties d'eau, et d'une solution de protéine de froment à 2 p. c., contenant 30^{mg} d'azote environ, dans une solution d'acide lactique à 0.4 p. c. On a ainsi, au mélange, une concentration de la protéine de froment à 1 p. c. qui donne, dans les 20^{cc} de liquide, conjointement avec les matières albuminoïdes de l'extrait de malt, la teneur totale en azote de 50^{mg}. L'acidité est donc de 0.2 p. c. d'acide lactique, outre les phosphates acides de l'extrait de malt. Le liquide est mis dans des fioles jaugées de 100^{cc} ou de 50^{cc}, placées dans des bains-marie (comme bains-marie on s'est servi de petits brassins); la température est de 47°—48° si on précipite par l'acide tannique; elle est de 50°—51° si c'est le chlorure stanneux qui sert de précipitant. Si on emploie les deux précipitants la température est, en général, de 50°. L'expérience dure 2 heures ou, en plusieurs séries d'essais, 3 heures. On arrête les essais en ajoutant les précipitants, pourtant pas avant d'avoir fait refroidir sous la fontaine si c'est l'acide tannique qui est le précipitant. On emploie 10^{cc} de solution d'acide tannique à 5 p. c. (+ un peu d'acétate de sodium), ou 20^{cc} de solution de chlorure stanneux, après l'addition de 10^{cc} de solution de chlorure de calcium à 10 p. c. Plus tard, on ajoute de l'eau distillée jusqu'au trait. On laisse les fioles jusqu'au lendemain ou plus longtemps, puis on filtre, on évapore, on décompose, on distille, on titre de la manière indiquée plus haut. Si le chlorure stanneux sert de précipitant il faut boucher les fioles. — On a toujours, cela va sans dire, fait des déterminations de contrôle au liquide à essayer par des précipitations directes avant que les enzymes aient pu agir, ce que j'appelle essais passifs par opposition aux essais actifs. On a presque toujours fait des essais doubles et des dosages parallèles dont on a tiré les moyennes, à moins que, pour des raisons particulières (des accidents pendant les opérations) il n'ait fallu en rejeter l'un.

Là où, dans ses traits principaux, la marche des expériences

diffère de celle qu'on vient de décrire, ce qui est le cas, par exemple, pour les essais de diffusion ou les recherches sur des propriétés déterminées des enzymes, on donnera, plus loin, tous les détails nécessaires.

III.

Lois générales de la protéolyse.

M'étant convaincu, par nombre d'expériences d'orientation, qu'un extrait aqueux de malt vert a des propriétés protéolytiques et qu'il est à même de transformer des matières protéiques étrangères, dans l'espèce la protéine de froment déjà nommée qui, dans des conditions convenables, se soustrait, en tout ou en partie, à la précipitation par certaines substances au bout d'un certain temps d'action des enzymes, j'ai passé à l'examen de l'influence qu'exercent, sur cette transformation, des variations apportées aux conditions des expériences. Pour obtenir des résultats comparables, il fallait opérer de manière à ne faire varier, autant que possible, dans la même suite d'expériences que le seul facteur dont on va mesurer l'influence.

Les facteurs qui ont été examinés ainsi sont partie ceux qui, comme la température, la quantité d'enzyme, la durée de l'expérience, etc., modifient généralement l'action des enzymes, partie ceux dont on ignore d'avance s'ils ont de l'influence, dans un sens ou dans un autre, comme les matières étrangères du milieu. Les résultats sont exprimés quantitativement par des chiffres indiquant la quantité d'azote qui, pendant les expériences, s'est soustraite à la précipitation par les précipitants employés, et, où il y a moyen, encore graphiquement par des courbes en prenant pour abscisses le facteur variant, pour ordonnées l'azote dédoublé, indiqué en milligrammes.

Je me suis toujours servi d'extraits de malt préparés de la même manière et d'une albumine toujours la même dans une solution et à une concentration toujours les mêmes (v. p. 164). Par conséquent, les lois trouvées pour la marche de la protéolyse dans des conditions variées, ne peuvent être déclarées valables que pour cet extrait-là de malt, et pour cette albumine-là. Aussi ne vais-je pas plus loin dans mes affirmations, en admettant qu'un procédé d'expérience différent donnerait des résultats différents. Cependant, je suis d'avis qu'il y a une certaine vraisemblance que, pour l'essentiel, la protéolyse se conforme aux lois trouvées aussi en se trouvant sous des conditions différentes, si elle se passe hors de la cellule vivante. Je pense aussi que ces lois donneront des indications ou des renseignements qui feront mieux comprendre ce qui se passe à l'intérieur de la cellule, où la protéolyse est réglée par le concours compliqué de tant d'autres

fonctions vitales qu'il sera extrêmement difficile ou, pour mieux dire, impossible de retracer, schématiquement, sa dépendance d'un seul agent extérieur.

Ce n'est que peu à peu que j'ai vu clairement combien est compliquée la transformation de la protéine de froment traitée ici. En effet, ce n'est qu'au fur et à mesure que mon travail s'avance et surtout lorsque j'ai mis la dernière main à l'ensemble de mes matériaux que j'en ai eu la reconnaissance nette. Comme cette transformation n'est accompagnée d'aucun dégagement de gaz, ni de la production de corps insolubles ou odorants, elle n'est pas directement perceptible à nos sens, différente ainsi d'autres fermentations, produites par des bactéries et des levûres (putréfaction, fermentation alcoolique). Néanmoins, elle ne le cède à ces fermentations ni en intensité ni en dédoublement profond de molécules compliquées, l'albumine se dédoublant très vite, presque totalement, en albumoses (et en peptones), puis se décomposant ultérieurement pour former des composés cristallins non protéiques, descendant même, en partie, à la molécule d'ammoniaque minérale¹⁾.

Il résulte encore de mes essais que les différentes phases de ce dédoublement ne sont pas toutes également influencées d'agents extérieurs, mais qu'en partie chacune d'elles suit ses lois. J'ai réussi, à ce que je crois, à distinguer assez rigoureusement deux, au moins, de ces phases: celle qui se découvre à la précipitation par le chlorure stanneux, et celle qui se découvre à la précipitation par le tannin. J'ai réussi aussi, ou à peu près, à les produire indépendamment l'une de l'autre. Je pense donc avoir démontré ainsi, et par d'autres indices, l'existence de deux enzymes, au moins, comme causes de la protéolyse en question.

Ce point de vue m'ayant guidé dans la représentation suivante des résultats particuliers, j'anticipe ici sur ce qui en ressortira, faisant ces observations partie pour orienter le lecteur, partie pour expliquer les expressions et les termes dont, pour être bref, je me suis servi, avant de les avoir fondés sur des raisons.

Il existe donc, à mon avis, dans l'orge en germination et dans

¹⁾ Comme il n'y a plus moyen de maintenir de distinction rationnelle entre les fermentations qui ne paraissent résulter que de l'action directe de microbes sur les matières fermentescibles et celles qui s'effectuent en dehors de la cellule vivante au moyen d'enzymes, on a le même droit d'appeler fermentation cette protéolyse qu'on a d'indiquer ainsi le dédoublement en alcool et en acide carbonique de la molécule du sucre au moyen de levûres ou de zymase. Il se peut bien que toutes les fermentations soient des effets d'enzymes qui ne sont pas nécessairement dus à des microbes. Voir aussi Johs. Schmidt et Fr. Weis: „Die Bakterien“, Jena, Fischer (1902, p. 218—221).

l'extrait qu'on en fait, deux enzymes. A celle des deux qui effectue les premières phases de la protéolyse (le dédoublement en albumoses et en peptones), j'applique le vieux terme de peptase, à l'autre, qui continue le dédoublement au-delà des peptones, celui de tryptase, d'après la ressemblance que portent ces enzymes aux enzymes animales correspondantes: la pepsine et la trypsine¹⁾. Dans le même sens je parlerai de la phase ou de l'action pepsique et de la phase ou de l'action tryptique, coïncidant avec les nombres et les courbes trouvés par les précipitations par le chlorure stanneux et par le tannin respectivement.

1. Dépendance de la température.

Parmi les traits caractéristiques des actions chimiques des enzymes, comparées à d'autres actions chimiques semblables telles que l'hydrolyse des hydrates de carbone sous l'action d'acides étendus, il faut nommer leur dépendance de la température. Certaines enzymes produisent la même hydrolyse d'un certain corps que les acides, mais tandis que l'action de ceux-ci est d'autant plus énergique que la température est plus élevée, l'action des enzymes s'arrête complètement à un maximum de température, situé, en général, au voisinage de 70°, et jamais beaucoup au-delà, étant le plus énergique à une température plus basse, l'optimum, située, le plus souvent, entre 40° et 60°. Et si on a, une fois, chauffé une enzyme en solution au maximum, il est impossible, en baissant la température, de lui rendre son activité: elle est détruite ou „morte“ une fois pour toutes. Il y aussi une température minima, située, en général, à quelques degrés au-dessus de zéro et au-dessous de laquelle l'enzyme reste inerte; mais, en ce cas, elle n'est pas détruite, quand même on la soumet à la congélation à des températures très basses: elle reste inerte seulement jusqu'à ce qu'on la rechauffe au-delà du minimum. Ainsi l'action diastasique, ou le pouvoir fermentatif, va en croissant — lentement — avec la température du minimum à l'optimum, et de là — assez brusquement — en

¹⁾ Du reste, je suis d'avis qu'il faudrait appliquer les termes de peptase et de tryptase comme noms communs à toutes les enzymes protéolytiques de nature pepsique et de nature tryptique, tout en retenant les noms de pepsine et de trypsine comme spécifiques aux enzymes animales, suivant l'usage généralement adopté. — Dans l'aperçu des fermentations que j'ai donné dans l'ouvrage de Schmidt et Weis: „Die Bakterien“, Jena, 1902, p. 231—32, je me suis servi du terme de peptase, mais pas encore de celui de tryptase. La raison en est qu'en vue de la confusion générale de la nomenclature de l'enzymologie, je n'ai pas voulu y introduire des termes nouveaux dans un livre étant plutôt un cours élémentaire.

décroissant jusqu'au maximum. L'action des acides, au contraire, va en croissant assez proportionnellement à la température jusqu'au point d'ébullition de la solution. On pourra donc conclure de l'aspect de la courbe de la température si on a affaire à une action d'enzymes (fermentation) ou à une action chimique, produite par d'autres moyens¹⁾.

Les actions diastasiques propres s'accordent, dans un grand nombre de phénomènes, avec les fonctions des cellules qui suivent toujours des courbes semblables. Comme les enzymes proviennent toujours de cellules vivantes, paraissant jouer un rôle extrêmement important pour les rapports entre celles-ci et le monde extérieur, cet accord n'a rien de surprenant. Remarquons seulement que les points cardinaux des courbes de température se déplacent quand l'enzyme est isolée de la cellule. En tout cas, le point du maximum et le point de l'optimum se trouveront alors, en général, plus haut, parce que, le plus souvent, déjà à des températures voisines de 50° la cellule meurt, amenant la destruction de ses enzymes. L'explication en est peut-être qu'à l'intérieur de la cellule il y a des températures plus élevées que nous ne supposons généralement, ou bien que l'énergie nécessaire se produit sous d'autres formes que celle de la chaleur. Sans approfondir cette question, je ferai observer que l'optimum de cette protéolyse se trouve à une température (environ 50°) qui ferait mourir la plantule de l'orge en germination, et qu'on ne saurait directement appliquer les résultats acquis ici au travail qui se fait à l'intérieur des cellules desquelles sont produites les enzymes.

Néanmoins, il est de la plus grande importance de connaître avec exactitude l'influence de la température sur les différentes phases de la protéolyse, partie pour pouvoir caractériser les enzymes qui en sont la cause, partie parce qu'en examinant l'influence des autres facteurs, il est important de connaître la température à laquelle on peut s'attendre aux effets les plus grands, vu qu'il est toujours préférable d'opérer à la température optima. Aussi la détermination des courbes de température était-elle parmi les premiers problèmes que j'ai essayé de résoudre au moyen de la précipitation par le tannin d'abord, puis après, au

¹⁾ Les actions catalytiques des métaux colloïdaux („Solen“) examinées par Bredig, Müller von Berneck, Ikeda, Reinders, et d'autres, semblent, en plusieurs cas, se rapprocher des enzymes (par l'action d'alcalis, de poisons, etc.) ce qui, à mon avis, n'autorise nullement à faire des identifications entre les deux. Elles diffèrent des actions diastasiques par l'influence qu'exerce sur elles la température. V. Georg Bredig: *Anorganische Fermente*, p. 65, Leipzig 1901. C. Ernst: *Katalyse des Knallgases durch colloïdalen Platin*, *Zeitschr. f. physikal. Chemie* XXXVII, 477 (1901).

moyen de la précipitation par le chlorure stanneux, aussitôt que j'avais reconnu l'importance de ce précipitant pour mes recherches.

Par les essais décrits plus haut (p. 138—39), Kjeldahl avait trouvé que l'optimum pour l'action protéolytique qui se découvre par le sulfate de cuivre, se trouve entre $50^{\circ}5$ et 55° ; mais à mes premiers essais d'orientation avec la précipitation par l'acide tannique, il paraissait être situé entre 45° et 50° . Comme plus tard, en précipitant par le chlorure stanneux, j'ai eu les plus grands effets plus près des points indiqués par Kjeldahl, il devenait nécessaire, vu la possibilité de l'influence du précipitant employé sur les résultats obtenus, d'examiner, par des essais particuliers, l'action à tous les degrés de température entiers entre 45° et 50° pour les deux précipitants.

On a fait les essais du groupe auquel l'acide tannique était le précipitant au mois de Janvier 1899. On employait un extrait de malt fait d'une partie de malt vert écrasé sur deux parties d'eau distillée, mais dont on n'a pas dosé directement l'azote total. D'après le tableau dressé à la page 159—60, on peut l'évaluer, en toute sûreté, à environ 13^{mg} d'azote par 10^{cc} , parce qu'on y trouvait $6^{\text{gr}}.66$ que l'acide tannique ne précipitait pas. On a fait agir 10^{cc} de cet extrait sur 10^{cc} d'une solution de protéine de froment à 2 p. c. dans de l'acide lactique à 0.4 p. c., pendant deux heures. Comme il était d'importance d'employer le même extrait à tous les essais et que je ne disposais pas d'un nombre d'étuves à température constante suffisant pour faire tous les essais à la fois, j'ai dû les diviser en quatre séries, qui ont été faites, les deux premières, le même jour à une heure d'intervalle, la troisième le lendemain, la quatrième le troisième jour. En attendant, l'extrait de malt, emballé dans de la glace, était placé dans une armoire glacière, à 0° . Pour mieux le conserver, j'ai ajouté du thymol, dont je ne connaissais pas encore l'influence affaiblissante sur le pouvoir fermentatif. Aussi les chiffres des deux dernières séries sont-ils relativement plus bas que ceux des deux premières, mais toutes les courbes vont essentiellement dans le même sens. — Le liquide à essayer était renfermé dans des fioles jaugées de 200^{cc} , placées, pendant deux heures, à des endroits différents:

A la température de	0°	dans de l'eau glacée.
—	—	- 5° dans l'armoire glacière.
—	—	- 10° dans un rafraichissoir au sous-sol.
—	—	- 15° au laboratoire.
—	—	- 25° à l'étuve.
—	—	- 30° — 70° dans des bains-marie pourvus de thermo-régulateurs.

Pour arrêter les expériences, on ajoutait 10^{cc} d'une solution d'acide tannique à 5 p. c., après avoir refroidi, sous la fontaine, les fioles des températures élevées.

Pour l'appréciation de l'exactitude de mes chiffres, je communique, dans les tableaux ci-dessous de mes résultats par rapport à l'influence de la température, tous les chiffres de mes journaux, c'est à dire, outre les quantités d'azote trouvées, les données des titrages desquelles sont calculées les quantités d'azote¹⁾. Comme, pour les déterminations, on a toujours employé la moitié du filtrat des précipités du tannin et du chlorure stanneux, on a multiplié par 2 le chiffre trouvé de la quantité d'azote, ce qui double les erreurs du titrage.

En rapprochant ces chiffres et, surtout, en les exprimant graphiquement par un système de courbes (v. Pl. I, courbes inférieures),

1^{re} Série, le 27 Janvier 1899, de 11 h. 30 à 1 h. 30.

Expé- riences	Température	Titre	Moyenne	Az du filtrat	Az dédoublé
nos.	centimètres cubes	centimètres cubes	centimètres cubes	milligrammes	milligrammes
Contrôle	(10 ^{cc} de H ² SO ⁴ concentré)	19.54 }	19.54 }	6.66	.
—		19.54 }	3.33 }		
131	(passif)	16.18 }	16.21 }		
132	—	16.25 }			
133	5°	16.25 }	16.21	6.66	0.00
134	—	16.18 }			
135	15°	16.00 }	16.00	7.08	0.42
136	—	— }			
137	25°	15.50 }	15.50	8.08	1.42
138	—	15.50 }			
139	35°—37°	14.12 }	14.31	10.46	3.80
140	—	14.50 }			
141	45°	13.55 }	13.54	12.00	5.34
142	—	13.51 }			
143	50°	13.52 }	13.52	12.04	5.38
144	—	13.52 }			
145	55°	14.46 }	14.44	10.20	3.54
146	—	14.42 }			
147	60°	15.20 }	15.19	8.70	2.04
148	—	15.18 }			

¹⁾ Plus loin je ne citerai que les chiffres de la quantité d'azote trouvés ainsi.

II^e Série, le 27 Janvier 1899, de 2 h. 40 à 4 h. 40.

Expé- riences	Température	Titre	Moyenne	Az du filtrat	Az dédoublé
nos.		centimètres cubes	centimètres cubes	milligrammes	milligrammes
149	(passif)	16.25 }	16.24	6.60	.
150	—	16.23 }			
151	47°	13.48 }	13.53	12.02	5.42
152	—	13.58 }			
153	49°	13.71 }	13.67	11.74	5.14
154	—	13.63 }			
155	51°	13.77 }	13.80	11.48	4.88
156	—	13.82 }			
157	53°	13.85 }	13.87	11.34	4.74
158	—	13.88 }			

III^e Série, le 28 Janvier 1899, de 2 h. à 4 h.

Expé- riences	Température	Titre	Moyenne	Az du filtrat	Az dédoublé
nos.		centimètres cubes	centimètres cubes	milligrammes	milligrammes
159	(passif)	16.19 }	16.21	6.66	.
160	—	16.22 }			
161	46°	14.02 }	13.96	11.16	4.50
162	—	13.92 }			
163	48°	13.92 }	13.92	11.24	4.58
164	—	13.92 }			
165	52°	14.15 }	14.14	10.80	4.14
166	—	14.13 }			
167	54°	14.46 }	14.58	9.92	3.26
168	—	14.70 }			

IV^e Série, le 30 Janvier 1899, de 11 h. 30 à 1 h. 30.

Expé- riences	Température	Titre	Moyenne	Az du filtrat	Az dédoublé
nos.		centimètres cubes	centimètres cubes	milligrammes	milligrammes
169	(passif)	16.13 }	16.14	6.80	.
170	—	16.15 }			
171	50°	14.25 }	14.18	10.72	3.92
172	—	14.10 }			
173	65°	15.63 }	15.44	8.20	1.40
174	—	15.25 }			
175	70°	16.01 }	16.10	6.88	0.08
176	—	16.18 }			

on trouve que l'optimum est situé à 47° — 48° , le minimum au-dessus de 5° , le maximum à quelque 70° .

Les expériences du second groupe, auquel c'est le chlorure stanneux qui sert de précipitant, ont été faites à la fin d'Avril 1901. L'extrait employé était d'abord préparé de 1000^{gr} de malt vert écrasé et de 1333^{gr} d'eau (3 : 4), donnant 810^{cc} de liquide filtré. Mais pour pouvoir comparer ces expériences aux précédentes, on a dilué l'extrait, de manière à avoir 1 partie de malt pour 2 parties d'eau. Ainsi en 10^{cc}, l'extrait renferme 12^{mg}.52 d'azote total, dont 6^{mg}.20 se sont soustraits à la précipitation par l'acide tannique (Comp. p. 169). Du reste, la marche des essais était la même que celle suivie au premier groupe, si ce n'est que les expériences ne duraient qu'une heure. Des expériences antérieures m'ont appris qu'au bout de deux heures tout l'azote, ou à peu près, d'une solution de protéine à 1 p. c., peut être dédoublé de sorte qu'il se soustrait à la précipitation par le chlorure stanneux. Or, comme il n'y a pas moyen d'obtenir des résultats utiles si la réaction s'achève complètement, ou presque complètement, avant l'expiration de la durée de l'expérience, j'ai préféré de fixer à 1 heure cette durée, d'autant plus que l'entassement des produits de la fermentation pourrait troubler l'expérience. Si alors la relation entre la courbe construite des chiffres trouvés et la courbe de la précipitation par le tannin se déplace un peu dans le sens vertical on a, par compensation, l'avantage de ne pas employer du thymol, mais un extrait de malt tout frais au pouvoir fermentatif non affaibli. Le peu de durée de l'expérience présente l'avantage de vous permettre de terminer tous les essais le jour même. Ceux-ci ont été divisés en trois séries avec une demi-heure, ou une heure, d'intervalle. Ainsi ils ont été terminés tous au courant de 4 heures et demie, période pendant laquelle le pouvoir fermentatif ne peut guère s'être changé. On chauffa d'avance, dans la fiole, la solution de protéine, la mettant dans un bain-marie pendant quelque temps, avant d'y ajouter l'extrait de malt. Celui-ci, au contraire, était, au commencement de l'expérience, à la température ambiante. Il y a là une source d'erreur peu importante mais qui pourra se faire sentir, peut-être, aux températures élevées en diminuant l'action au-dessous de l'optimum et autour de lui, en augmentant l'action au-dessus de l'optimum (ce qui explique le petit trait positif à 70°). — On a arrêté les essais en ajoutant, sans refroidissement préalable, au liquide 5^{cc} de solution de chlorure de calcium à 10 p. c. et 20^{cc} de solution de chlorure stanneux nouvellement préparée. Comme on se servait de fioles jaugées de 50^{cc}, il n'a fallu ajouter que très peu d'eau pour remplir jusqu'au trait.

Le tableau ci-contre montrera les résultats des expériences. Comme

I ^{re} Série				II ^e Série			III ^e Série			I ^{re} + II ^e + III ^e Séries		
Température	Expériences	Titre	Az du filtrat	Expériences	Titre	Az du filtrat	Expériences	Titre	Az du filtrat	Température	Az du filtrat	Az dédoublé
	nos.	centimètres cubes	mg	nos.	centimètres cubes	mg	nos.	centimètres cubes	mg		mg	mg
10 ^{cc}	Centr.	19.60)	19.60	"	"	"	"	"	"	"	"	"
17 ⁸⁰	1821	13.96)	13.64	"	"	"	"	"	"	(passif)	11.92	0.00
(passif)	1822	13.32)	12.46	"	"	"	"	"	"	4°	14.28	2.36
4°	1825	—	12.46	"	"	"	"	"	"	20°	14.82	2.90
20°	1826	12.46)	12.19	"	"	"	"	"	"	35°	20.90	8.98
—	1827	12.28)	9.15	"	"	"	"	"	"	40°	23.90	11.98
—	1828	12.10)	20.90	"	"	"	"	"	"	42° 5	25.40	13.48
35°	1829	9.10)	23.90	"	"	"	"	"	"	45°	26.88	14.96
—	1830	9.20)	1843	6.86)	6.90	25.40	"	"	"	46°	27.28	15.36
40°	1831	7.70)	1844	6.94)	5.92)	5.96	27.28	"	"	47°	28.12	16.20
—	1832	7.60)	1845	5.92)	5.04	29.12	1857	5.70)	5.54	48°	29.12	17.20
42° 5	"	"	1846	6.00)	4.96)	1848	1858	5.38)	4.70)	49°	29.80	17.88
—	"	"	1847	5.12)	4.70)	1859	1860	4.70)	4.70	50°	30.00	18.08
45°	1833	6.32)	1848	4.96)	4.48)	4.53	1861	4.48)	4.53	51°	30.14	18.22
—	1834	6.00)	1849	4.84)	4.71	29.78	1862	4.58)	5.00	52°	29.78	17.86
46°	"	"	1850	4.58)	5.02)	5.00	1863	5.02)	4.98)	53°	29.20	17.28
—	"	"	1851	5.32)	5.27	28.66	1864	4.98)	"	54°	28.66	16.74
47°	"	"	1852	5.22)	"	"	"	"	"	55°	27.92	16.00
—	"	"	1853	7.80)	7.76	23.68	"	"	"	57° 5	23.68	11.76
48°	"	"	1854	7.72)	"	"	"	"	"	60°	21.82	9.90
—	"	"	1837	5.65)	5.64	27.92	"	"	"	65°	16.52	4.60
49°	"	"	1838	5.62)	"	"	"	"	"	70°	12.64	0.72
50°	1835	—	1839	8.70)	8.69	21.82	"	"	"	75°	12.60	0.68
—	1836	4.60)	1840	8.68)	"	"	"	"	"			
51°	"	"	1841	11.22)	11.34	16.52	"	"	"			
—	"	"	1842	11.46)	"	"	"	"	"			
52°	"	"	1855	13.44)	13.28	12.64	"	"	"			
—	"	"	1856	13.12)	"	"	"	"	"			
53°	"	"	1865	—	13.30	12.60	1866	13.30)	13.30			
54°	"	"	1866	13.30)	"	"	"	"	"			
55°	1837	5.65)	1838	5.62)	"	"	"	"	"			
—	1838	5.62)	1839	8.70)	8.69	21.82	1840	8.68)	"			
57° 5	"	"	1841	11.22)	11.34	16.52	1842	11.46)	"			
60°	1839	8.70)	1840	8.68)	"	"	1841	11.22)	11.34			
—	1840	8.68)	1841	11.22)	11.34	16.52	1842	11.46)	"			
65°	1841	11.22)	1842	11.46)	"	"	1855	13.44)	13.28			
—	1842	11.46)	1856	13.12)	"	"	1865	—	13.30			
70°	"	"	1866	13.30)	"	"	1866	13.30)	13.30			
75°	"	"	1865	—	13.30	12.60	1866	13.30)	13.30			
—	"	"	1866	13.30)	"	"	"	"	"			

Az total de 10^{cc} d'extrait de malt..... 12^{mg} 52— — de solution de protéine..... 30^{mg} 60Az total de 20^{cc}..... 43^{mg} 12¹ Ce jour-là la température de l'armoire glacière était de 4°, celle du laboratoire de 20°.

le tableau précédent, il donne tous les chiffres de mon journal. Si on relie les chiffres trouvés dans une courbe qu'on inscrit sur la planche de la courbe établie pour la précipitation par l'acide tannique, quoique les deux ne soient pas commensurables sur tous les points, plusieurs faits sauteront aux yeux.

D'abord, l'action que constate la précipitation par le tannin est, quantitativement, beaucoup moins étendue que celle sur laquelle nous éclaire la précipitation par le chlorure stanneux. Puis, la courbe de l'acide tannique n'a pas d'optimum bien défini. L'accroissement de 35° à 47° — 48° n'est pas très fort; il y a plutôt, à ce qu'il paraît, une zone optima entre 45° et 50° . De là le décroissement vers 70° , le maximum, est aussi très uniforme, mais à cette température l'activité s'arrête complètement. Remarquons, pourtant, que l'action à 60° est bien plus basse qu'à 35° , tandis qu'à la précipitation par le chlorure stanneux la tendance est dans le sens inverse, l'action étant un peu plus intense à 60° qu'à 35° . Ce n'est qu'au-delà de 5° que l'action est perceptible, mais elle est très faible encore à 15° , à peine $0^{\text{mg}}.5$ d'azote dédoublé.

La courbe du chlorure stanneux, au contraire, a un point optimum à 51° , avec accroissement rapide avant ce point et avec décroissement plus rapide encore après lui. A 35° et à 60° l'action est, à peu près, la même, mais la moitié seulement de ce qu'elle est à 51° . Rien ne se passe à 70° et 75° : l'enzyme est détruite. Les petits traits positifs de $0^{\text{mg}}.72$ et $0^{\text{mg}}.68$ respectivement d'azote dédoublé peuvent, nous l'avons dit, s'expliquer par la température de l'extrait de malt au moment où, au commencement de l'expérience, on l'a ajouté à la solution de protéine chaude: c'était à la température ambiante que le mélange a eu lieu, et il a fallu quelques minutes pour qu'elle s'élève à 70° et à 75° . Il faut donc supposer que le mélange a été, pendant un moment, à la température optima, ce qui a donné à l'enzyme l'occasion d'agir. Ce qui se passe aux températures basses est particulièrement digne d'attention; avant tout, la force de l'action à 4° . J'aurais cru à une erreur grave si plusieurs autres séries d'expériences n'avaient donné des résultats identiques¹⁾. Cependant, le peu de différence entre les actions à 4° et à 20° s'explique, pour ce groupe d'essais, en partie, par une erreur expérimentale, et le chiffre de 4° est un peu trop élevé. En effet, je n'avais pas,

¹⁾ Ainsi dans deux séries d'expériences le dédoublement de l'azote était dans l'une à 4° : $5^{\text{mg}}.34$, à 20° : $13^{\text{mg}}.06$; dans l'autre à 4° : $6^{\text{mg}}.18$, à 20° : $13^{\text{mg}}.52$. Les essais duraient 3 heures. A cette durée assez longue les effets sont si grands et s'accordent si bien entre eux qu'il n'y a pas moyen de s'y tromper.

avant d'opérer le mélange de l'extrait de malt et de la solution de protéine, pris soin de les refroidir séparément. Les mélangeant à la température ambiante, je les ai mis dans l'armoire glacière. La plus grande partie de la surface de la fiole n'y étant en contact qu'avec l'air, sans être plongée dans un liquide froid, le refroidissement s'est fait moins vite, et ce n'est peut-être que vers la fin de la durée brève de l'expérience qu'il a atteint 4°¹).

Plus tard, en parlant des résultats obtenus au moyen d'un certain nombre d'autres précipitants: chlorure mercurique, sulphate de zinc, acétate uranique, acide phosphotungstique, et au moyen de dosages

- ¹) Les effets plus grands de la durée plus longue (3 heures), comparés à ceux de la durée plus brève, prouvent que l'action continue après le refroidissement. — Il faut, cependant, ne pas oublier un fait sur lequel j'ai déjà attiré l'attention p. 162: si on précipite séparément, par du chlorure stanneux, un extrait de malt et une solution de protéine la quantité totale précipitée est plus grande que celle d'un mélange des deux, quand même la précipitation se fait immédiatement après le mélange. Ceci indique peut-être que l'action de la peptase est très rapide donnant, pour ainsi dire, des effets notables instantanément, et il s'ensuit des essais cités qu'elle est assez énergique à des températures relativement basses. Des séries d'expériences postérieures viennent confirmer ces conclusions. Je citerai des chiffres: dans des essais faits à la température optima de 51°, il y avait:

au bout de 15 minutes	12.86	milligrammes d'Az dédoublé			
- - - 30 -	18.22	-	-	-	-
- - - 45 -	22.98	-	-	-	-
- - - 1 heure	25.10	-	-	-	-
- - - 2 heures	28.34	-	-	-	-
- - - 3 -	28.74	-	-	-	-
- - - 4 -	28.70	-	-	-	-

Dans d'autres essais, faits à 20°, il y avait:

au bout de 1/2 heure	2.08	milligrammes d'Az dédoublé			
- - - 1 -	5.44	-	-	-	-
- - - 2 heures	8.32	-	-	-	-
- - - 4 -	15.88	-	-	-	-

Dans cette dernière série, le chiffre d'une demi-heure est peut-être un peu trop bas par suite d'une erreur expérimentale. Mais comme ces chiffres ont été obtenus en multipliant par 4, parce que, par exception, on n'y employait que 5^{cc} d'extrait de malt + 5^{cc} de solution de protéine, l'erreur a été quadruplée. Cependant, tout compté, on voit qu'aux températures plus élevées il faut compter avec une action presque instantanée et que l'action de la peptase dans le sens indiqué est assez énergique déjà à 4°. Il serait intéressant d'apprendre si elle existe aussi à 0° et au-dessous; mais je n'ai pas encore fait d'expériences à ce sujet.

d'ammoniaque par distillation avec la magnésie, je vais discuter en détail les actions chimiques qui sont exprimées par les courbes de la Pl. I. Rappelons ici que le chlorure stanneux ne précipite, à ce qu'il faut croire, que les matières albuminoïdes proprement dites et non dédoublées, tandis que l'acide tannique précipite aussi les albumoses et les peptones.

Il serait d'un grand intérêt, sans doute, de déterminer aussi les courbes de température des autres précipitants que je viens de nommer. C'est aussi ce que j'ai essayé en faisant des séries d'essais à des températures différentes: 4° , 19° , 31° , 33° , 47° , 60° . Ces essais, cependant, on les a faits avant de se douter qu'on avait affaire à un dédoublement d'une rapidité et d'une intensité telles que révélaient, plus tard, les essais avec le chlorure stanneux¹⁾, ou que les différentes phases du phénomène avaient des optima de température différents. Aussi, pour obtenir des traits bien prononcés, étendais-je toujours la durée jusqu'à 3 heures, et suis-je descendu bien au-dessous du point le plus favorable à une des fonctions²⁾, au moins, en supposant que 47° était l'optimum commun. Il est évident que la relation des courbes de précipitation a été troublée, de sorte qu'elles ont perdu une grande partie de leur valeur en tant que courbes de température. Aussi ces essais présentent-ils un plus grand intérêt dans une autre connection (v. plus loin, IV, 4). —

Reste à comparer mes résultats avec ceux de mes devanciers qui ont traité la question de la température. Windisch et Schellhorn³⁾ ont fait des essais d'autodigestion. Ils se servent surtout d'extraits de malt touraillé et clair, finement moulu, mais aussi de malt vert écrasé, dont les plumules sont longues de $\frac{2}{3}$ à $\frac{3}{4}$ de la longueur du grain. On digère le malt avec des quantités d'eau différentes pendant un temps de 5 quarts d'heure à 3 heures. Les températures des essais sont: 5° — 7° , 11° — 15° , 22° — 24° , 37° , 42° , 50° , 52° . Dans la même série d'expériences, on n'applique jamais plus de cinq températures différentes. Les essais durent de 20 à 24 heures, après l'addition de chloroforme, à titre d'antiseptique. On poursuit la marche

¹⁾ Presque toutes les indications de la littérature à ce sujet sont les résultats d'essais prolongés, durant des jours ou des mois, tant pour les enzymes protéolytiques végétales que pour les animales.

²⁾ Rappelons ici qu'à la courbe de chlorure stanneux de la Pl. I l'effet est plus faible à 47° qu'à 51° de 2^{me} , quoique, dans ce cas, l'extrait de malt fût de beaucoup plus faible que celui de ces essais, et que la durée ne fût que d'une heure.

³⁾ Windisch und Schellhorn: Wochenschr. f. Brauerei XVII, 409 ss. (1900).

de l'action en déterminant: 1° l'albumine coagulable, en faisant bouillir pendant 2 minutes; 2° les albumoses, en précipitant le filtrat des albumines par du sulfate de zinc; 3° les soi-disant peptones¹⁾, en précipitant par l'acide phosphotungstique le filtrat de la précipitation par le sulfate de zinc. 4° le soi-disant azote amidé, en faisant bouillir avec de l'acide chlorhydrique²⁾, pendant une heure, le filtrat des albumines, et en distillant l'ammoniaque. Que les résultats des deux dernières opérations soient extrêmement vagues, cela saute aux yeux.

— Les tableaux des auteurs font voir distinctement le décroissement tant des matières albuminoïdes que des albumoses (qu'on note bien la longue durée des expériences) avec l'accroissement de la température jusqu'à une certaine limite. C'est là un fait qui constitue aussi une des conclusions de leurs essais, malgré le peu d'exactitude de leurs déterminations et leurs erreurs graves, qui causent quelquefois des variations singulières au-dedans des températures auxquelles on pourrait s'attendre à un accroissement continu. Mais voilà la seule conclusion qu'ils soient en droit de tirer. Ils croient encore avoir trouvé „dass die Abbauprodukte, besonders wenn man das Enzym bei niedriger Temperatur wirken lässt, sehr weitgehend sind“. Ils relèvent même ceci comme le résultat principal de leurs essais. Mais toute personne qui examine leur étude, verra du coup que l'essai justement (essai 13) sur lequel ils fondent cette conclusion, invite à la plus grande circonspection, faisant soupçonner des erreurs graves aux déterminations de la „Zunahme der Peptone“. Il y a bien quelque chose de vrai à cette proposition dans sa généralité. Mais ils sont, sans doute, loin de la réalité en pensant que c'est surtout à 12° et autour de cette température (à 5° ils ont une indication en sens inverse) que les „soi-disant peptones“ se dédoublent ultérieurement.

Fernbach et Hubert³⁾ ont, de même, fait des expériences d'autodigestion avec un extrait de malt touraillé, stérilisé par filtration à la bougie Chamberland. Ils ont réussi à rendre incoagulables 45 p. c. des matières albuminoïdes primitivement coagulables. Ils disent entre autres choses: „Dans les conditions du brassage, la solubilisation de l'azote par la diastase protéolytique est déjà active à la température de 40°; la température optima est voisine de 60°, mais l'activité est encore considérable à 70°.“ Ces indications paraissent s'écarter un peu de mes résultats. Je doute aussi que l'optimum soit si haut. Peut-être n'ont-ils pas un assez grand nombre de températures pour

¹⁾ Expression des auteurs.

²⁾ Ils n'en indiquent pas la force.

³⁾ Fernbach et Hubert: C. r. CXXX, 1783—85 (26/ 1900).

pouvoir déterminer, avec assez d'exactitude, ce point. Leur communication ne permet pas d'en juger. Mais quant à l'activité plus grande qu'ils ont trouvée à 70°, il est possible que l'enzyme du malt touraillé soit plus résistante aux températures élevées que celle du malt vert. De plus, d'après ces auteurs, les produits diffèrent selon la température. En se servant de l'acide phosphotungstique pour séparer l'azote peptonisé de l'azote amidé, ils trouvent qu'à 40° la totalité de l'azote appartient à des composés amidés non précipitables au réactif mentionné; à 60° l'azote amidé ne constitue plus que 50 p. c. à 60 p. c. de l'azote solubilisé, et, à 70°, à peine 40 p. c.* Ce résultat, suivant lequel le dédoublement est le plus profond aux températures relativement basses, et auquel sont arrivés aussi Windisch et Schellhorn, s'accorde essentiellement avec les miens. Là aussi, il faut se rappeler, cependant, qu'ils ont tous prolongé leurs expériences pendant un temps très long, pendant lequel les albumoses formées d'abord ont été, peu à peu, dédoublées à leur tour, l'action trypsique, suivant mes essais, étant presque tout aussi énergique à 35° qu'à 47°, tandis qu'elle est très faible à 60°. La formation des albumoses, au contraire, atteint, à l'optimum, son plus haut point de développement au bout de très peu de temps, 2—3 heures, se produisant encore énergiquement à 60°.

Petit et Labourasse¹⁾ ont fait des expériences de brassage avec du malt „faiblement touraillé“, qu'ils ont digéré avec de l'eau distillée pendant 2 heures à des températures différentes.

Ils trouvent le maximum de matières dissoutes à 55°, tandis que la formation des albumoses et des corps amidés paraît être le plus grande à 40°—45°.

Il est impossible de tirer des conclusions sur la dépendance de la température des différentes phases des enzymes protéolytiques ou de la protéolyse au moyen d'essais comme ceux que nous venons de nommer. Les conditions des expériences sont trop compliquées. Les conditions d'extraction y interviennent. La coagulation des matières protéiques, qui commence déjà à des températures relativement basses, est une cause perturbatrice. Le manque de réactifs propres à séparer les différents produits de dédoublement se fait sentir davantage. Les chiffres obtenus sont tous des chiffres de proportions et qui ne permettent pas de calculer les mesures absolues du pouvoir fermentatif.

Je laisserai aussi de côté les essais de brassage assez nombreux, à des températures différentes, que j'ai faits moi-même. Je renvoie, à

¹⁾ Petit et Labourasse: C. r. CXXXI, 349—51 (20/7, 1900).

ce sujet, partie à ce que j'ai publié autrefois¹⁾, partie à une étude qui paraîtra plus tard dans ces Comptes rendu et dans laquelle on traitera à part ces essais et une série d'essais nouveaux.

Si donc les résultats auxquels sont arrivés les auteurs nommés, diffèrent des miens à certains égards, il n'y faut attacher aucune importance. En réalité, des essais avec un extrait de malt vert agissant sur une matière protéique ajoutée, sont incommensurables à des essais d'autodigestion avec un extrait de malt touraillé, ou à des essais de brassage avec le malt torréfié à la touraille. Peut-être que les enzymes, après une première torréfaction, pourront agir aussi plus tard, à une température plus élevée (Fernbach et Hubert) que lorsqu'on les extrait directement des grains frais en germination²⁾; mais les communications brèves des savants français ne permettent pas de contrôler leurs expériences, et, en dehors des différences déjà nommées entre leur méthode et la mienne, il peut y en avoir eu d'autres qui auront exercé une influence décisive sur les résultats.

Voici, à peu près, le résumé des conclusions auxquelles m'ont conduit mes expériences à l'égard de la dépendance de la température du pouvoir fermentatif protéolytique d'un extrait de malt vert, en tout cas pour la protéolyse de la protéine de froment:

1° La première phase de la protéolyse, le dédoublement en albumoses, s'opère avec des effets assez vigoureux déjà à des températures relativement basses (4°, 20°); avec rapidité et intensité à 51°, température qui forme un optimum prononcé et auquel l'effet est presque deux fois aussi énergique qu'à 35° et à 60°. Le minimum est au-dessous de 4°; le maximum est à 70°, ou au-dessous.

2° Le dédoublement plus profond, la transformation des albumoses en produits non précipitables au tannin, s'opère beaucoup plus lentement que le dédoublement en albumoses. Il a son optimum entre 45° et 50° (à 47°—48° probablement), mais, sur ce parcours, la courbe est parallèle, à peu près, à l'axe des abscisses. A 35°, l'effet n'est qu'un peu plus faible qu'à 47°, mais à 60°, il est beaucoup plus faible, ayant cessé entièrement à 70°. Après deux heures, l'effet est nul à 5°, et extrêmement faible à 15°.

¹⁾ Fr. Weis: Ueber das proteolytische und ein eiweisskoagulirendes Enzym in keimender Gerste (Malz). Zeitschr. f. physiol. Chemie XXXI, 79—97 (1900).

²⁾ Kjeldahl (v. p. 139) qui a aussi, tant qu'on peut comprendre de son journal, opéré avec des extraits de malt touraillé, a trouvé de même, nous l'avons vu, des effets notables à 70°.

2. Dépendance de la quantité de ferment.

Il est impossible de faire des recherches absolument exactes de l'influence de cet agent, tant qu'on ne pourra produire l'enzyme à l'état pur, sans parler des cas où on ne peut la produire à l'état solide sans affaiblir considérablement le pouvoir fermentatif, mais où il faut opérer avec des extraits contenant nombre d'autres matières. En effet, aussitôt qu'on y fait varier la quantité de ferment, on fait varier, en même temps, beaucoup d'autres facteurs. Dans un cas comme le présent, où l'extrait de malt contient des quantités considérables de matières protéiques, partie restées intactes, partie dédoublées par les enzymes protéolytiques, un facteur tel que la concentration des matières albuminoïdes variera avec la quantité de ferment. Et même s'il y a moyen, comme nous le ferons voir plus loin, d'éliminer approximativement cette cause perturbatrice, d'autres facteurs, par exemple la teneur variée en phosphates du liquide à essayer qu'on additionne aussi avec l'extrait de malt, pourront modifier la marche de la protéolyse.

On ne pourra donc pas tirer des conclusions particulièrement importantes des essais suivants de l'influence de la quantité de ferment sur la protéolyse, d'autant plus qu'ils présentent des défauts étrangers aux circonstances dont nous venons de parler. Cependant, des recherches de ce genre sont indispensables à la connaissance exacte de cette protéolyse et des enzymes qui en sont la cause. Je soumettrai donc ceux de mes essais qui y visent.

Je ne me suis servi du chlorure stanneux comme précipitant qu'à une seule série d'essais, employant aux autres l'acide tannique. Aussi les résultats portent-ils sur la phase trypsique de la protéolyse principalement.

Voici comment j'ai opéré aux essais faits en employant l'acide tannique: Pour porter la relation entre les 10^{cc} ordinaires de solution de protéine et les 10^{cc} d'extrait de malt au-delà de cette dernière quantité, sans changer la concentration de protéine et d'acide lactique du liquide, on part de solutions de protéine plus concentrées que les solutions ordinaires à 2 p. c. A cette fin, on a fait une solution de 5 p. c. de protéine dans de l'acide lactique aqueux à 1 p. c. A la 1^{ère} série d'essais on en emploie 10^{cc}, que, par l'additionnement de quantités variées d'infusion de malt (0, 5, 10, 15 ... 40^{cc}) et d'eau distillée, on porte toujours au volume total de 50^{cc} contenant 1 p. c. de protéine et 0.2 p. c. d'acide lactique. A la II^e série on a, par suite de circonstances particulières (v. plus loin), opéré avec une solution de protéine un peu plus faible; mais dans celle-ci, et à la III^e série, je suis parti d'une solution de protéine de 15^{cc} à 5 p. c., et le volume a été complété, comme tout à l'heure, mais à 75^{cc}. Pour comparer les

résultats obtenus avec d'autres, les chiffres des tableaux suivants sont réduits aux 20^{cc} ordinaires de liquide à essayer contenant 1 p. c. de protéine et 0.2 p. c. d'acide lactique (à l'exception de la II^e série). — En même temps, on a fait des essais d'autodigestion avec les mêmes extraits, étendus d'eau au même volume, en ajoutant de l'acide lactique en quantité correspondante. En soustrayant les chiffres obtenus ainsi de l'azote dédoublé total on détermine l'azote dû au dédoublement de la protéine. Comme, naturellement, les diverses quantités d'extraits de malt présenteront, à très peu de chose près, le même rapport entre l'azote total et l'azote non précipité et que, pendant la même durée, l'azote dédoublé sera presque le même, fait que m'ont appris un grand nombre d'essais d'autodigestion, les tableaux pourront servir non seulement à calculer l'étendue de l'autodigestion de tous les extraits employés, mais on sera en droit d'appliquer les mêmes valeurs à des séries d'essai auxquelles n'est entré aucun essai d'autodigestion.

Les essais ont été faits à 47°; ils ont duré 2 heures.

I^{ère} Série (Essais nos. 379—414). L'extrait contient, en 10^{cc}, 16^{mg}.35 d'azote, dont 8^{mg}.88 non précipitable par l'acide tannique. La protéine, calculée à 0^{gr}.2, correspondant à 10^{cc} d'une solution à 2 p. c., contient 30^{mg}.42 d'Az. L'azote total du liquide varie d'après la quantité de l'extrait, ainsi que fait voir la deuxième colonne du tableau.

I^{ère} Série.

30 ^{mg} .42 d'Az de protéine				Az du filtrat		Az dédoublé		
				Az total	pour commencer	au bout de 2 heures	total	de l'extrait
cc	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
0 d'extrait contenant 0.00 d'Az...		30.42	0.08	0.08	—	—	—	—
2 — — 3.27 — ...		33.69	1.80	2.97	1.17	(0.47)	(0.70)	
4 — — 6.54 — ...		36.96	3.60	6.58	2.98	1.02	1.96	
6 — — 9.81 — ...		40.23	5.40	10.98	5.58	(1.41)	(4.17)	
8 — — 13.08 — ...		43.50	7.20	14.26	7.06	1.81	5.25	
10 — — 16.35 — ...		46.77	9.00	18.18	9.18	(2.35)	(6.83)	
16 ¹⁾ — — 26.16 — ...		56.58	14.40	26.26	11.86	3.75 ²⁾	8.11	

II^e Série (Essais nos. 415—438). L'extrait contient, en 10^{cc}, 17^{mg}.21 d'azote, dont 9^{mg}.56 non précipitable par l'acide tannique. La solution de protéine est la même qu'à la série précédente, mais, pour en avoir

¹⁾ Les essais avec 12^{cc} et 14^{cc} d'extrait ont échoué.

²⁾ D'après les trois déterminations de 4^{cc}, 8^{cc}, 16^{cc} d'extrait en 2^{cc}, l'autodigestion fera 0^{mg}.47 environ, dont on a calculé les chiffres entre parenthèses. On s'est servi d'un calcul semblable aux tableaux suivants.

assez, on a étendu 275^{cc} à 5 p. c. à 310^{cc}. Ainsi le liquide à essayer, réduit à 20^{cc}, ne contient que 23^{mg}.84 d'azote de protéine. Après l'ébullition, on ajoute du thymol à la solution de protéine. Ceci, ajouté à la concentration relativement plus faible, a fait que, malgré la quantité plus grande d'azote, l'action de cet extrait est un peu moins énergique que l'action de l'extrait de la série précédente.

III^e Série (Essais nos. 623—646). On ne fait pas de dosage de l'azote total de l'extrait de malt. En 10^{cc} d'extrait, 10^{mg}.00 d'azote se sont soustraits à la précipitation par l'acide tannique. On ne fait pas de dosage non plus de l'azote de la solution de protéine. Mais je suis partie d'une solution à 5 p. c. Par conséquent, dans le liquide à essayer réduit (20^{cc}) il y aura environ 30^{mg}.00 d'azote-protéine = 1 p. c. de protéine; à cette série les effets étaient beaucoup plus vigoureux qu'aux séries précédentes.

II^e Série.

23 ^{mg} .84 d'Az-protéine		Az total	Az du filtrat		Az dédoublé		
			pour commencer	au bout de 2 heures	total	de l'extrait	de la protéine
cc	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
6.6 d'extrait contenant	11.35 d'Az..	35.19	6.56	11.66	5.10	1.51	3.59
8.0 —	13.76 — ..	37.60	7.82	14.71	6.89	(1.84)	(5.05)
9.3 —	16.00 — ..	39.84	9.09	16.90	7.81	(2.13)	(5.68)
10.6 —	18.23 — ..	42.07	10.36	18.90	8.54	(2.43)	(6.11)
12.0 —	20.64 — ..	44.48	11.62	20.71	9.09	(2.76)	(6.33)
13.3 —	22.88 — ..	46.72	12.89	22.49	9.60	3.06	6.54
14.6 —	25.11 — ..	48.95	14.16	24.27	10.11	(3.36)	(6.75)
16.0 —	27.52 — ..	51.36	15.42	26.28	10.86	(3.69) ¹⁾	(7.17)

III^e Série.

0 ^{gr} .2 de protéine		Az du filtrat		Az dédoublé		
		pour commencer	au bout de 2 heures	total	de l'extrait	de la protéine
cc		mg	mg	mg	mg	mg
0.0 d'extrait de malt		0.02	0.02	—	—	—
2.6 —	—	2.67	5.42	2.75	(0.61)	(2.14)
5.3 —	—	5.34	12.10	6.76	(1.24)	(5.52)
8.0 —	—	8.01	18.03	10.02	(1.88)	(8.14)
10.6 —	—	10.68	23.16	12.48	(2.47)	(10.01)
13.3 —	—	13.35	27.95	14.60	(3.12)	(11.48)
16.0 —	—	16.02	30.77	14.75	(3.75) ¹⁾	(11.00)

¹⁾ V. note 2 p. 182.

On ajoute, à titre de comparaison, une série d'essais où le chlorure stanneux a servi de précipitant:

IV^e Série (Essais nos. 1919—1930, 1936—1940). A ces essais l'extrait de malt contient, en 10^{cc}, 18^{mg}.54 d'azote total, dont 12^{mg}.42 imprécipitable par le chlorure stanneux. On emploie partout 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c., contenant 31^{mg}.74 d'azote. On varie avec des extraits de malt de 0^{cc} à 10^{cc}; là où le volume de l'extrait employé est au-dessous de 10^{cc}, on étend d'eau de manière à porter toujours le volume du liquide à essayer à 20^{cc}. On ne fait aucun essai d'autodigestion avec de l'extrait de malt seul¹⁾. La température est de 51°; la durée est de 2 heures.

IV^e Série.

31 ^{mg} .74 d'Az-protéine				Az total	Az du filtrat		Az dédoublé	
					pour com- mencer	au bout de 2 heures	total	de la protéine seule ²
cc	mg			mg	mg	mg	mg	mg
0 d'extrait de malt contenant 0.00 d'Az...				31.74	1.64	1.64	0.00	—
2 — — —	3.71	—	..	35.45	4.12	10.84	6.72	(6.20)
4 — — —	7.40	—	..	39.14	6.60	22.04	15.44	(14.40)
6 — — —	11.10	—	..	41.84	9.08	32.56	23.48	(21.92)
8 — — —	14.80	—	..	46.54	11.56	38.84	27.28	(25.20)
10 — — —	18.54	—	..	50.28	14.06	43.28	29.22	(26.62)

Les résultats de ces séries sont exprimés graphiquement sur la planche II. Les deux courbes supérieures, dont l'une pleine et l'autre ponctuée, indiquent la quantité d'azote qui s'est soustraite, pendant le temps d'expérience appliqué, à la précipitation par le chlorure stanneux, toutes les autres indiquant, pareillement, la précipitation par l'acide tannique. La courbe la plus basse exprime l'autodigestion dans un des extraits de malt employés, l'acide tannique servant de précipitant. Les autres courbes pleines indiquent la quantité totale d'azote dédoublé de la solution de protéine + l'extrait de malt, tandis que les

¹⁾ Voici, à titre de comparaison, quelques données d'une autre série d'expériences. L'extrait de malt y contenait, en 10^{cc}, 19^{mg}.10 d'azote et 12^{mg}.70 d'azote imprécipitable par le chlorure stanneux. Après 3 heures d'autodigestion à 47°, 15^{mg}.24 d'azote sont restés imprécipitables par le chlorure stanneux; après 5 heures 15^{mg}.44 d'azote. Donc, dans ces espaces de temps, il y avait en 2^{mg}.54 et 2^{mg}.74 d'azote de dédoublés; par conséquent, 3^{mg}.86 et 3^{mg}.66 d'azote restaient sans dédoublement.

²⁾ Calculé d'après la valeur de l'autodigestion (pour 10^{cc}, 2^{mg}.6), indiquée à la note précédente.

deux courbes ponctuées montrent la quantité de protéine seule, dédoublée aux séries I et IV.

Il va sans dire que les courbes qui indiquent la quantité totale d'azote dédoublé, s'élèvent forcément avec la quantité d'extrait de malt, mais on pourrait, sans doute, se figurer que le dédoublement de protéine ne croîtrait pas, avec la quantité croissante de ferment, au-delà d'une certaine limite.

3. Dépendance de la concentration de la solution de protéine.

En faisant des expériences d'orientation pour reconnaître les meilleures conditions (température, durée, acidité, etc.) donnant les résultats relativement les plus grands, il est d'importance de choisir une concentration convenable de l'albumine (dans mon cas la protéine de froment) soumise à l'action de l'extrait de malt. Cette concentration doit satisfaire aux conditions suivantes: elle ne doit pas entraver l'action des enzymes; elle doit donner des indications notables pour de petites variations aux conditions des expériences sans que, cependant, la réaction finisse au-dedans de la durée ordinaire d'expérience; enfin, elle doit se prêter, sans grandes difficultés, aux dosages d'azote auxquels, on le sait, il est préférable que la matière, soumise à l'examen, ne contienne pas des quantités trop grandes d'azote. Une solution qui se montre très convenable au-dedans de la durée de 2 heures des expériences modèles est celle, à 2 p. c. de protéine, dont 10^{cc} contiennent environ 30^{mg} d'azote, et qui, additionnée de son volume d'extrait de malt, donne une concentration de 1 p. c. de protéine. Elle s'est montrée satisfaisante surtout tant que je n'ai employé, comme précipitant, que l'acide tannique, n'examinant ainsi que la phase profonde de la protéolyse (action de la tryptase).

Le choix de cette concentration s'appuie aussi sur les essais que nous allons décrire ci-dessous. On y emploie des solutions qui, additionnées d'extrait de malt, donnent des concentrations de protéine à $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4, 5 p. c. On y détermine aussi, pour les concentrations diverses, la quantité tant absolue que pour 100 d'azote-protéine imprécipitable par le tannin au bout de 2 ou de 5 heures de l'action de l'extrait de malt.

Aux trois séries d'essais A (nos. 717—736), B (nos. 737—752), C (nos. 753—774), on a employé trois extraits de malt différents. A aucun d'eux on n'a dosé l'azote total; mais 10^{cc} en contenaient au filtrat du précipité par le tannin 9^{mg}.84, 9^{mg}.74, 8^{mg}.64 d'azote respectivement. On a fait toutes les différentes concentrations de protéine de la même solution de protéine à 10 p. c. et de laquelle 1^{cc} contenait 15^{mg}.09 d'azote. Pour déterminer la quantité de protéine

1 p. c. de protéine = 30 ^{mg} .18 d'azote- protéine	A nos. 717—736 Az dédoublé au bout de 2 heures à 47°			B nos. 737—752 Az dédoublé au bout de 2 heures à 47°			C nos. 753—774 Az dédoublé au bout de 5 heures à 47°		
	total	de la protéine	pour 100 d'Az- protéine	total	de la protéine	pour 100 d'Az- protéine	total	de la protéine	pour 100 d'Az- protéine
	mg	mg		mg	mg		mg	mg	
0.00 p. c. de protéine ...	2.76	0.00	0.00	2.76	0.00	0.00	3.04	0.00	0.00
0.25 - = 7 ^{mg} .55 d'Az	4.64	1.88	24.9	—	—	—	6.46	3.42	45.3
0.50 - = 15 ^{mg} .09 —	6.28	3.52	23.3	—	—	—	9.60	6.56	43.5
1.00 - = 30 ^{mg} .18 —	9.24	6.48	21.5	9.36	6.60	21.9	13.96	10.92	36.2
2.00 - = 60 ^{mg} .36 —	12.20	9.44	15.6	13.00	10.24	17.0	18.66	15.62	25.9
3.00 - = 90 ^{mg} .54 —	15.74	12.98	14.3	14.58	11.82	13.1	21.38	18.34	20.3
4.00 - = 120 ^{mg} .72 —	15.30	12.54	10.4	13.80	11.04	9.1	22.32	19.28	16.0
5.00 - = 150 ^{mg} .90 —	15.48	12.72	8.4	14.68	11.92	7.9	22.96	19.92	13.2

échappant peu à peu à la précipitation par le tannin, on a fait des essais avec des extraits de malt seuls, additionnés d'eau acidulée d'acide lactique. Les résultats des trois séries d'essais sont donnés au tableau suivant et à la planche III *a* et *b*.

On voit qu'aux concentrations basses la quantité de protéine dédoublée est le moins grande, prise absolument, mais le plus grande pour 100 de protéine. A tous les essais, le maximum d'effet est atteint s'il y a 3—4 p. c. de protéine, c.-à-d. le dédoublement d'azote-protéine est, dans ce cas, aussi grand qu'aux concentrations plus élevées (5 p. c.), ou à partir de ce point les courbes passent, au-dedans d'une durée fixe (2 ou 5 heures), presque parallèlement à l'axe des abscisses. Mais pour 100 de protéine l'effet n'y est que moitié aussi grand qu'à 1 p. c. En choisissant cette concentration aux expériences modèles, on économise considérablement la protéine, dont la production demande beaucoup de temps et un grand travail.

A d'autres essais, qui ne seront communiqués que plus loin (p. 189; Pl. IX, X) parce qu'on y examine aussi l'influence de la durée de l'essai à des concentrations diverses de protéine (1, 2¹/₂, 5 p. c.), on précipitait à la fois par le chlorure stanneux et par l'acide tannique. On pourrait, sans doute, détacher les résultats de ces essais pour l'action des durées de 2 et de 5 heures en les comparant à ceux dont je viens de parler, mais je me contenterai de renvoyer à cette partie, tant au tableau qu'aux conclusions que je tire de ces essais (v. III, 7).

4. Dépendance du temps.

Il va de soi qu'à toute action de ferment il faut prendre en considération le temps en déterminant l'influence des autres facteurs. En

mesurant le pouvoir fermentatif et en déterminant l'intensité d'une fermentation, on fait toujours, naturellement, comme à la mesure de tout travail mécanique, entrer le temps en la définition.

Le temps que demandent les enzymes diverses pour finir la réaction qui les caractérise, ou pour la mener au point auquel les conditions de l'essai lui permettent d'atteindre, varie beaucoup. Il dépend d'agents tels que température, quantité de ferments, nature et concentration des matières en fermentation, réaction du liquide à essayer, présence de matières étrangères, etc. Mais, du reste, en présence des conditions les plus favorables, on voit, par exemple, que la présure achève sa réaction caractéristique presque instantanément, ou au bout de quelques minutes; que l'amylase atteint son maximum au bout de $\frac{1}{2}$ à 1 heure, tandis que l'invertase pourra continuer d'agir pendant des heures, voir même des jours, et que d'autres enzymes, entre autres des enzymes protéolytiques, continueront pendant des mois. On a, sans doute, considéré ces dernières, notamment les enzymes tryptiques, comme assez lentes dans leur action. Aussi plusieurs entre ceux (Green, Butkewitsch, Windisch et Schellhorn) qui ont opéré avec des enzymes protéolytiques végétales, se sont-ils servis, de préférence, de temps d'essai longs. Je démontrerai que la conséquence en a été que les premières phases de la protéolyse, par exemple la formation d'albumose, leur ont échappé; aussi n'a-t-on pas bien saisi la vitesse et l'intensité avec lesquelles pourra s'achever la protéolyse.

Pendant la première partie de mon travail — tant que je me servais du tannin comme seul précipitant — j'avais l'esprit prévenu, pensant que la dépendance du temps de la protéolyse s'exprimerait par une courbe qui aurait atteint, au bout de quelques heures, son maximum et qui, après, passerait parallèlement à l'axe des abscisses. Mais mes premières expériences n'ayant pas confirmé cette supposition, j'étais disposé à voir dans ce fait l'influence perturbatrice d'autres agents (des bactéries, par exemple). J'ai donc répété ces expériences de temps à autre, variant toujours quelque peu les conditions; ainsi j'ai additionné du thymol pour exclure les bactéries. Mais toutes les séries d'essais ont donné, essentiellement, le même résultat: la croissance continue de la courbe, en tout cas, jusqu'à et au-delà de vingt-quatre heures de temps d'essai. J'ai fait ainsi un plus grand nombre d'essais qu'il n'était strictement nécessaire pour la détermination de la courbe de temps de la phase tryptique de la protéolyse; mais comme ils se confirment tous, je les citerai.

On trouvera les résultats au tableau ci-contre (v. aussi Pl. IV). Voici quelques notions sur les conditions:

Précipitation par l'acide tannique.

Heures	I ^e Série 50°		II ^e Série 50°		III ^e Série 47° (du thymol après 5 heures)		IV ^e Série 47°	
	Az du filtrat	Az dé- doublé	Az du filtrat	Az dé- doublé	Az du filtrat	Az dédoublé	Az du filtrat	Az dé- double
en heures	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
0	5.23	"	6.39	"	10.72	"	7.10	"
1/2	6.71	1.48	"	"	13.86	3.14	"	"
1	8.34	3.11	"	"	16.52	5.80	12.44	5.34
1 1/2	8.68	3.45	"	"	17.86	7.14	"	"
2	"	"	11.97	5.58	19.26	8.54	15.52	8.42
2 1/2	"	"	"	"	21.06	10.34	"	"
3	11.17	5.94	13.24	6.85	(22.72)	(12.00)	16.92	9.82
3 1/2	"	"	"	"	"	"	18.10	11.00
4	"	"	14.24	7.85	22.06	11.84	19.04	11.94
4 1/2	"	"	"	"	"	"	19.36	12.26
5	"	"	14.96	8.57	23.66	12.94	20.08	12.98
6	"	"	"	"	24.04	13.32	20.80	13.70
9	"	"	"	"	24.92	14.20	24.32	17.22
12	"	"	"	"	25.64	14.92	"	"
18	16.10	10.87	"	"	"	"	"	"
24	"	"	22.09	15.70	29.22	18.50	30.98	23.88
48	"	"	25.94	19.55	32.42	21.70	"	"
72	"	"	"	"	32.64	21.92	"	"

I^e Série (Essais nos. 28—44). Température 50°. L'extrait de malt est fait d'une partie de malt vert et de deux parties d'eau; en 10^{cc}, il contient 5^{mg}.23 d'azote imprécipitable par le tannin.

II^e Série (Essais nos. 56—69). Elle ne varie de la I^{ère} que par le fait que l'azote de 10^{cc} d'extrait de malt imprécipitable par le tannin est de 6^{mg}.39.

III^e Série (Essais nos. 473—508). Température 47°. L'extrait de malt, préparé de trois parties de malt et de quatre parties d'eau, contient, en 10^{cc}, 19^{mg}.33 d'azote total, dont 10^{mg}.60 imprécipitable par le tannin. 10^{cc} de solution de protéine contiennent 29^{mg}.90 d'azote total. Le liquide à essayer en contient donc, en tout, 49^{mg}.23. De 10^{cc} d'extrait de malt + 10^{cc} de solution de protéine 10^{mg}.72 d'azote sont imprécipitables par le tannin. A partir de cinq heures de temps d'essai on ajoute du thymol, qui ralentit un peu l'action.

IV^e Série (Essais nos. 647—670). Température 47°. Je n'ai pas de notes sur la préparation de l'extrait de malt, ni sur sa teneur en azote total. 7^{mg}.10 d'azote sont restés imprécipitables par le tannin. Aucune

addition d'antiseptiques. Au bout de 24 heures, l'odeur du liquide est assez fraîche, un peu acide, peut-être, mais nullement putréfiée¹⁾.

Les chiffres de la première colonne de chaque série du tableau indiquent la quantité totale d'azote devenue imprécipitable par le tannin, ceux de la deuxième colonne la quantité dédoublée pendant le temps d'essai.

On voit du tableau qu'une action manifeste se fait encore, à la II^e série et à la III^e série, dans l'espace de temps de 24 à 48 heures; tandis qu'il n'y en a point dans celui de 48 à 72 heures (III^e série).

Les courbes (v. Pl. IV) des I^{re} et II^e séries sont plus basses que celles des autres séries. Ceci est dû, partie à la faiblesse plus grande des extraits de malt, partie au fait que la température, 50°, est moins favorable que celle de 47°. Il faut attribuer à l'influence affaiblissante du thymol additionné sur l'enzyme le fait que la courbe de la III^e série descend vers l'axe des abscisses au bout de 5 heures. (Voir le tableau p. 187).

La Pl. IV présente encore une courbe indiquant les résultats d'essais faits pour faire voir la marche, pendant la première partie de la durée de l'expérience, de l'action révélée par la précipitation par le chlorure stanneux. La comparaison de cette courbe à celles du tannin présente un intérêt tout spécial.

V^e Série (Essais nos. 1917—26, 1946—52). Température 51°. L'extrait de malt se prépare de 3 parties de malt + 4 parties d'eau; en 10^{cc}, il contient 18^{mg}.54 d'azote. 10^{cc} de solution de protéine contiennent

Précipitation par le chlorure stanneux.

V^e Série. 51°.

	Az du filtrat	Az dédoublé	Az dédoublé par 15 minutes
	mg	mg	mg
Au bout de 0 minutes....	14.94	—	—
— 15 —	27.80	12.86	12.86
— 30 —	33.16	18.22	5.36
— 45 —	37.92	22.98	4.76
— 1 heure	40.04	25.10	2.12
— 2 heures.....	43.28	28.34	0.81
— 3 —	43.68	28.74	0.10
— 3 ¹ / ₄ —	43.60	28.66	(± 0.08)

¹⁾ La réaction acide est, en elle, peu favorable au développement de bactéries. Je n'ai jamais observé de putréfaction ni d'autre fermentation au liquide à essayer, pas même après des essais prolongés, si l'extrait de malt et la protéine lactique sont mêlés ensemble. Il se produit vite, au contraire, une fermentation acide ou une putréfaction fétide à l'extrait de malt traité seul.

31^{mg}.74 d'azote: donc en tout 50^{mg}.28 d'azote. On chauffe d'avance les deux solutions à la température de l'expérience.

Ces chiffres et la courbe qu'on en a faite font voir combien est grande la vitesse de cette action. Elle atteint son maximum au bout de 2 heures environ. En tout cas, il n'y a pas d'accroissement à partir de 3—3¹/₄ heures, et, à en juger par d'autres essais (v. la série suivante), il faut supposer qu'au bout des 3 heures la courbe passerait presque parallèlement à l'axe des abscisses; aussi cette partie en est tracée sous forme d'une ligne ponctuée. L'accroissement est le plus fort pendant les premières 15 minutes, beaucoup moins fort pendant les 15 minutes suivantes, allant toujours en décroissant. On peut trouver l'explication de ce fait, partie en ce que les substances fermentescibles se consomment peu à peu, ce qui affaiblit la concentration, partie dans l'influence retardatrice des produits de dédoublement entassés.

En partant de la supposition qu'au moyen de précipitants différents on pourra diviser, par groupes, les matières albuminoïdes proprement dites et leurs produits de dédoublement, par exemple, d'après la méthode de H. Schjerning, j'en ai mis en jeu un certain nombre, variant mes essais de diverses manières, les continuant aussi pendant un temps plus ou moins long. Il est très intéressant de constater jusqu'à quel point le rapport entre les divers produits de dédoublement reste inaltéré ou varie pendant des temps d'essai où on est à même de maintenir à peu près constantes les autres conditions. J'ai obtenu des résultats intéressants, sous ce rapport, par les essais suivants:

VI^e Série (Essais nos. 1711—1776). Ignorant encore que les actions diverses avaient des températures optimæ diverses, j'ai fait ces essais à la température de 47°. L'extrait de malt est préparé de 3 parties de malt et de 4 parties d'eau. Il contient, par 10^{cc}, 18^{mg}.84 d'azote. 10^{cc} de la solution de protéine contenant 31^{mg}.46 d'azote, l'azote total du liquide est de 50^{mg}.30. Pour éviter des solutions trop étendues et pour économiser les précipitants, on se sert de fioles tarées à 50^{cc}. Aux essais durant 24 et 48 heures on ajoute, de temps en temps, du toluol. Outre le chlorure stanneux et l'acide tannique on emploie, comme précipitants, du sulfate de zinc et de l'acétate uranique. De plus, en distillant le liquide avec de la magnésie calcinée, on détermine directement la quantité d'azote présent, aux temps divers, sous la forme d'ammoniaque. — Avant de soumettre les résultats de ces essais, je ferai quelques observations sur le mode d'emploi de ces précipitants et sur le dosage de l'ammoniaque.

On a fait la précipitation par le sulfate de zinc d'après la méthode dont se sont servis A. Bömer¹⁾ et, après lui, E. Zunz²⁾, et d'autres.

¹⁾ A. Bömer, Zeitschr. für anal. Chemie (Fresenius) XXXIV, 562 (1895).

²⁾ E. Zunz, Zeitschr. für physiol. Chemie XXVII, 219 (1899).

Avant d'additionner le sulfate de zinc, on rend faiblement acide le liquide en ajoutant 1^{cc} d'acide sulfurique étendu (1 partie d'acide sulfurique concentré et 4 parties d'eau) pour empêcher la précipitation de phosphate de zinc. On ajoute un peu plus que la quantité nécessaire à la saturation du liquide de sulfate de zinc en poudre (environ 27^{gr}). On agite les fioles, qu'on remplit jusqu'au trait par une solution saturée du sel. Il faut avoir soin d'en ajouter assez pour qu'au bout de 24 heures il en reste encore un petit peu d'indissous. On dissout facilement, avant la filtration, ce restant en chauffant légèrement la fiole. L'évaporation du filtrat (avant l'addition d'acide sulfurique concentré) se fait dans une étuve à 105⁰, au courant de la nuit.

On précipite par l'acétate uranique d'après H. Schjerning¹⁾ en se servant d'une solution saturée, à 7 p. c. environ, de ce composé; on remplit jusqu'au trait de la fiole en ajoutant environ 30^{cc}. Après chauffage au bain-marie bouillant pendant 10 minutes, le précipité se fait à souhait. On place les fioles dans un endroit où elles soient protégées contre la lumière jusqu'à la filtration.

On interrompt les essais pour le dosage d'ammoniaque en portant les fioles, pendant 5 à 10 minutes, au bain-marie en ébullition, arrêtant ainsi l'action des enzymes. Puis, pour tuer et pour exclure les bactéries, on ajoute une forte quantité de toluol. Plus tard, on chasse celui-ci en faisant bouillir, après l'addition d'un peu d'acide sulfurique étendu, au bain-marie (l'opération procède assez lentement à cause du point d'ébullition élevé du toluol), pour prévenir la formation de mousse pendant la distillation. On emploie 2^{gr} de magnésie calcinée à la distillation de chaque fiole. Le dosage d'ammoniaque se fait comme à l'ordinaire.

Les résultats de ces essais sont groupés au tableau suivant. Les chiffres de la première colonne de chaque précipitant indiquent, en milligrammes, la quantité d'azote imprécipitable par ce précipitant. Ceux de la deuxième colonne indiquent la quantité d'azote dédoublé par heure des temps d'essai successifs. Enfin, ceux au-dessous de „Magnésie“ indiquent la quantité d'azote présent sous forme d'ammoniaque et changé en ammoniaque par heure.

Ces résultats sont aussi montrés graphiquement à la Pl. V. La courbe de chlorure stanneux fait preuve du même accroissement rapide que la courbe correspondante de la série V. Au courant de la première heure, la plupart de l'azote dédoublable est dédoublée; au bout de trois heures, ceci est le cas pour, à peu près, tout l'azote dédoublable, c'est à dire presque tout l'azote-protéine en présence. Il y a,

¹⁾ H. Schjerning: Zeitschr. f. anal. Chemie XXXVII, 413 (1898).

VI^e Série. 47°. Azote total: 50^{mg}.30.

Nos. 1711—1776	Chlorure stanneux		Sulfate de zinc		Acide tannique		Acétate uranique		Magnésio	
	Az en milli-grammes		Az en milli-grammes		Az en milli-grammes		Az en milli-grammes		Az en milli-grammes	
	du filtrat	dédouble par heure	du filtrat	dédouble par heure	du filtrat	dédouble par heure	du filtrat	dédouble par heure	du liquide distillé	formé par heure
Au bout de 0 heures	15.62	—	11.60	—	10.48	—	9.64	—	1.06	—
— - 1 —	40.40	24.78	18.64	7.04	16.96	6.48	20.12	10.48	1.35	0.29
— - 2 —	42.36	1.96	24.28	5.64	21.16	4.20	24.84	4.72	—	—
— - 3 —	43.76	1.40	25.24	0.96	23.52	2.36	26.74	1.90	2.84	0.75
— - 4 —	43.72	+0.04	28.54	3.30	24.80	1.28	27.24	0.50	—	—
— - 5 —	43.76	0.04	30.04	1.50	25.80	1.00	28.80	1.56	—	—
— - 6 —	44.68	0.92	31.52	1.48	27.04	1.24	29.00	0.20	3.42	0.19
— - 9 —	45.16	0.16	34.12	0.87	31.16	1.37	32.20	1.07	—	—
— - 12 —	45.28	0.04	37.96	1.28	34.96	1.27	33.92	0.57	4.48	0.17
— - 24 —	45.76	0.04	40.44	0.21	38.04	0.26	—	—	4.76	0.02
— - 48 —	45.32	+0.02	43.88	0.15	41.08	0.13	38.28	0.12	5.20	0.02

cependant, une faible croissance continue de 3 à 9 heures comprenant, en tout, environ 2^{mg} d'azote. De 9 à 48 heures, au contraire, la courbe passe absolument parallèlement à l'axe des abscisses. On peut, sans doute, attribuer les petites variations aux quantités d'azote qu'on y trouve aux erreurs expérimentales. — En constatant que l'action exprimée par la courbe de chlorure stanneux s'achève si vite, il faut se rappeler qu'on opère avec une concentration relativement faible de protéine (1 p. c.). En effet, d'autres essais ont démontré que l'aspect de la courbe est autre si on se sert de concentrations plus fortes (v. p. 198). Tandis que l'action révélée par la précipitation par le chlorure stanneux s'achève relativement vite, les autres courbes de précipitation montrent que la protéolyse continue par le dédoublement ultérieur des produits premièrement dédoublés. — Je n'entrerais pas ici en détail dans le côté qualitatif de la protéolyse. Je me contenterai de rappeler que le sulfate de zinc précipite, outre des albumines non dédoublées, les albumoses; que l'acide tannique, dans ce cas-ci, précipite probablement encore la plupart des vraies peptones; que, d'après Schjerning¹⁾, l'acétate uranique précipite tout ce qu'on appelle peptones et les dérivés ultérieurs en ne laissant dans la solution que les bases hexoniques, les amines, les amides et d'autres produits cristallins

¹⁾ Schjerning: Zeitschr. f. anal. Chemie XXX, 419 (1898).

de dédoublement plus profonds. On voit donc que les actions qu'expriment ces courbes se continuent bien au-delà des 9 heures, et jusqu'à 12 heures, avec une intensité assez grande. De là, il y a un accroissement plus lent, mais toujours notable, jusqu'à 48 heures et, probablement, au-delà encore. Après les 48 heures, la courbe de sulfate de zinc est sur le point de couper la courbe de chlorure stanneux, ce qui revient à dire qu'à peu près toutes les albumoses formées d'abord se sont ultérieurement dédoublées. La distance entre la courbe de sulfate de zinc et celle d'acide tannique est restée presque constante entre 2 et 48 heures, ce qui semble indiquer que les substances marquées par cette distance sont ultérieurement décomposées presque aussitôt formées, n'étant qu'un point de passage des albumoses à d'autres composés. La courbe d'acétate uranique qui, pendant les 3 premières heures, passe très près de celle du sulfate de zinc, s'incline, au bout de ce temps, en descendant, et vient couper la courbe d'acide tannique; mais, au bout de 12 heures, elle passe de nouveau presque parallèlement aux autres courbes avec un accroissement continu jusqu'à 48 heures. Au bout de ce temps, la partie de beaucoup la plus grande (75.1 p. c.) de l'azote total se trouve dans des composés plus simples que les peptones (c.-à-d. imprécipitables par l'acétate uranique), tandis qu'au commencement de l'essai il n'y avait que 19.1 p. c. de ces matières (c.-à-d. 57 p. c. en ont été dédoublés). La courbe indiquant l'azote distillé directement par la magnésie nous dit encore que la protéolyse est avancée jusqu'à la formation d'ammoniaque, dont il s'est formé des quantités assez considérables.

En résumé, on voit que le tableau qui se dessine des différentes phases de la protéolyse, si on recourt à l'emploi de précipitants divers, varie beaucoup avec le temps d'essai: celui-ci est un agent ayant une influence décisive sur les résultats auxquels on arrive en faisant varier un facteur pendant des temps d'essai variés.

5. Dépendance du temps à des températures différentes.

Il est naturel de supposer, à priori, qu'à une température au-dessous de l'optimum une enzyme pourra produire essentiellement le même effet qu'à ce point-là, si on lui laisse un temps d'agir assez long. Mais si on la fait agir à des températures au-dessus de l'optimum, il arrivera peut-être que, tout long que soit le temps d'essai, il ne pourra remédier au manque d'une température favorable. En effet, il se peut que la température élevée ait pour effet, non pas de retarder l'action diastasique, mais d'affaiblir l'activité de l'enzyme même, la rendant inerte peu à peu, ou même la décomposant complètement. Ainsi donc la différence entre les actions exercées sur l'enzyme par les tem-

pératures au-dessous et au-dessus de l'optimum sera tant qualitative que quantitative.

Les essais suivants nous renseigneront peut-être sur la question de savoir jusqu'à quel point ces suppositions tiennent bon dans notre cas.

Essais nos. 1869—1916. En 10^{cc}, l'extrait de malt contient 18^{mg}.20 d'azote, la solution de protéine en contient 30^{mg}.60. Il y a donc 48^{mg}.80 d'azote total. Les essais sont groupés en cinq séries aux températures respectives de 20°, 35°, 50° (47°—50°), 60°, 65°. Le temps d'essai varie au-dedans de chaque série. Pour chaque série on emploie 42^{cc} de la solution de protéine et 43^{cc} d'extrait de malt. Avant de les mélanger (donc au commencement de l'essai), on les chauffe à la température d'essai. Après les avoir mélangés dans des fioles de 100^{cc}, on les secoue vigoureusement. Puis on les met dans des bains-marie, où on les laisse aux températures voulues.

I^{re} Série. 20°.

	Précipitation par le chlorure stanneux		Précipitation par l'acide tannique	
	Az du filtrat	Az dédoublé	Az du filtrat	Az dédoublé
	mg	mg	mg	mg
Au bout de 0 heure ..	17.12	0.00	10.00	0.00
— 1/2 — ..	19.20	2.08	10.52	0.52
— 1 — ..	22.56	5.44	(11.00)	(1.00)
— 2 heures .	25.44	8.32	11.48	1.48
— 4 — .	33.00	15.88	12.68	2.68

II^e Série. 35°.

III^e Série. 50°. ¹⁾

	Précipit. par le chlorure stann.		Précipit. par l'acide tannique			Précipit. par le chlorure stann.		Précipit. par l'acide tannique	
	Az du filtrat	Az dédoublé	Az du filtrat	Az dédoublé		Az du filtrat	Az dédoublé	Az du filtrat	Az dédoublé
	mg	mg	mg	mg		mg	mg	mg	mg
Au bout de 0 heure	17.12	0.00	10.00	0.00	Au bout de 0 heure	17.12	0.00	10.00	0.00
1/2 —	24.64	7.52	11.56	1.56	1/2 —	31.68	14.56	12.40	2.40
1 —	31.92	14.80	13.08	3.08	1 —	37.68	20.56	14.40	4.40
2 heures	37.20	20.08	15.64	5.64	2 heures	39.84	22.72	17.20	7.20
4 —	39.44	22.32	18.36	8.36	4 —	41.04	23.92	20.40	10.40

¹ La température varie, dans cette série, entre 47° et 50°.

IV^e Série. 60°.V^e Série. 65°.

	Précipit. par le chlo- rure stann.		Précipit. par l'acide tannique			Précipit. par le chlo- rure stann.		Précipit. par l'acide tannique	
	Az du filtrat	Az dé- doublé	Az du filtrat	Az dé- doublé		Az du filtrat	Az dé- doublé	Az du filtrat	Az dé- doublé
Au bout de	mg	mg	mg	mg	Au bout de	mg	mg	mg	mg
0 heure	17.12	0.00	10.00	0.00	0 heure	17.12	0.00	10.00	0.00
1/2 —	23.20	6.08	11.92	1.92	1/2 —	22.72	5.60	10.80	0.80
1 —	(34.80) ¹	17.68	12.96	2.96	1 —	24.00	6.88	11.28	1.28
2 heures	35.12	18.00	14.08	4.08	2 heures	25.28	8.16	11.28	1.28
4 —	37.04	19.92	15.12	5.12	4 —	25.76	8.64	11.44	1.44

A divers temps, au bout de $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4 heures, on tire, après avoir secoué, de chaque fiole $2 \times 10^{\text{cc}}$ pour précipiter par le chlorure stanneux et par l'acide tannique. Ainsi on n'emploie, pour les précipitations, que la moitié de liquide de ce qu'on emploie aux autres essais. Comme les dosages de l'azote sont faits à la moitié des filtrats, les chiffres trouvés sont multipliés par 4 et non pas par 2, comme c'est le cas ailleurs. Les résultats se voient des tableaux ci-dessus.

On a aussi montré ces résultats aux planches VI et VII au moyen de courbes en prenant pour abscisses le temps et la température, et pour ordonnées „l'Az du filtrat“. On a choisi ces chiffres-là plutôt que ceux qui indiquent la quantité d'azote qui se soustrait à la précipitation par les deux précipitants pendant les temps d'essais, afin de rendre clair le rapport de ces deux courbes de précipitation. Comme points de départ du mesurage des deux courbes de 17.12 et de 10.00 on a tracé, sur les planches, une ligne ponctuée parallèle à l'axe des abscisses et qui indique la quantité d'azote des essais passifs qui, dès le commencement, se soustrait à la précipitation par le chlorure stanneux et par l'acide tannique.

Si, pour commencer, on regarde la Pl. VI, celle-ci semble parfaitement confirmer la supposition préconçue: les courbes de 20° et de 35° montrent un accroissement continu avec le temps. Si on avait continué les essais assez longtemps, elles auraient atteint (à l'exception, peut-être, de la courbe de l'acide tannique de 20°) la hauteur des

¹) Ce chiffre, évidemment, est trop élevé. J'ai aussi noté dans mon journal: „La température du bain-marie de 60° n'est pas restée constante tout le temps. De 0 à $\frac{1}{2}$ heure, elle n'a été que de 58°—59°; entre $\frac{1}{2}$ et 1 heure, elle a même, pendant un petit temps, descendu à 54°. Cette circonstance aura, sans doute, influé, dans le même sens, les autres chiffres de cette série.

courbes de 50°. C'est surtout l'accroissement de la courbe de chlorure stanneux de 20° qui est caractéristique: ici l'action est, à très peu près, proportionnelle au temps. Il est intéressant de comparer les courbes de chlorure stanneux de 35° et de 50°: elles marchent de front de telle façon que la première, au bout d'un temps d'essai double, a atteint tout juste la hauteur de la seconde. Les deux courbes de 60° sont, évidemment, un peu trop élevées (v. la note 2 de la p. 194); ceci est le cas, surtout, pour la courbe de chlorure stanneux de 1 heure. Cependant elles sont, toutes les deux, plus basses que les courbes de 35°, ayant une tendance prononcée à aller parallèlement à l'axe des abscisses au bout de 2 heures, tandis que l'action de la première demi-heure est la même, à peu près, qu'à 35°. Les courbes de 65° sont particulièrement intéressantes. Pendant la première demi-heure la différence entre celles-ci et les courbes de chlorure stanneux de 35° et de 60° correspondantes est presque nulle, mais pendant la demi-heure suivante, l'accroissement de la courbe de 65° est minime, étant plus faible encore de 1—2 heures; de 2—4 heures elle va, pour ainsi dire, parallèlement à l'axe des abscisses: pendant ce temps toute action a cessé. La courbe d'acide tannique atteint ce point déjà au bout de 1 heure, tandis que la courbe de chlorure stanneux continue à monter un peu de 1—2 heures. Par conséquent, l'action révélée par la précipitation par l'acide tannique (l'action trypsique) est encore plus sensible à la température élevée que l'action pepsique; en d'autres mots: la tryptase est complètement décomposée à 65° au bout d'une heure, tandis que la peptase n'est pas encore complètement décomposée au bout de 2 heures.

Les courbes de la Pl. VII mettent en évidence les mêmes résultats d'une autre manière, faisant voir plus facilement combien est avancée la protéolyse à des températures diverses, au bout de temps divers. Aussi n'entrerais-je pas plus avant dans des explications détaillées.

Il serait intéressant d'examiner si un extrait de malt, chauffé pendant 1—2 heures à 65°, a perdu pour toujours son pouvoir fermentatif, ou s'il n'est que paralysé pouvant redevenir actif à des températures plus basses. Je n'ai pas fait d'expériences directes à ce sujet. Mais Kjeldahl¹⁾ a examiné la question par rapport à la diastase. Il a trouvé que le pouvoir diastasique d'un extrait de malt qui a été exposé une fois à une température au-delà de l'optimum, est tellement affaibli que soumis, plus tard, à des températures plus favorables, il n'est pas régénérable, l'affaiblissement étant d'autant plus grand que l'extrait de malt a été exposé plus longtemps à la tempé-

¹⁾ J. Kjeldahl: Ces Comptes-rendus, I 121 (1879).

rature élevée. Il est probable qu'il en est de même pour les enzymes protéolytiques de l'extrait de malt. On y aura un parallèle complet de ce qui se passe chez les cellules vivantes telles que les bactéries: il y a une température maxima à laquelle on ne peut pas les chauffer sans les tuer, de même qu'elles sont tuées aussi si on les soumet à l'action plus ou moins prolongée de températures, au-dessous de celle-là, mais au-dessus de leur optimum¹⁾.

6. Dépendance du temps à des quantités de ferment différentes.

De même que les courbes de temps varient d'après les températures et que les courbes de température dépendent du temps, de même les courbes de temps varient d'après les quantités de ferment, et vice versa. Or, il s'agit de savoir s'il faut une quantité déterminée d'enzyme pour conduire, indépendamment du temps, une réaction à un point déterminé: ainsi, la transformation complète de la protéine demande-t-elle une quantité déterminée d'un ferment protéolytique, ou bien une quantité quelconque de ferment, toute petite qu'elle soit, conduit-elle la transformation aussi loin qu'une quantité plus grande, pourvu que celle-là agisse pendant un temps d'autant plus étendu? D'autre part, la réaction ne dépasse-t-elle jamais un point déterminé même en augmentant, sans restriction, la quantité de ferment? Pour éclaircir l'action des enzymes protéolytiques sous ce rapport, j'ai fait les essais que voici:

Essais nos. 1917—1945. Le chlorure stanneux seul servant de précipitant les résultats ne portent que sur la peptase. Température 51°—52°. En 10^{cc}, l'extrait de malt contient 18^{mg}.54 d'azote, la solution de protéine, à 2 p. c., 31^{mg}.74 d'azote: 12^{mg}.42 et 1^{mg}.64 d'azote respectivement sont imprécipitables au chlorure stanneux. La quantité d'extrait de malt varie allant de 0^{cc}, 2^{cc}, 4^{cc}, 6^{cc}, 8^{cc} à 10^{cc}. Le volume du liquide à essayer est toujours de 20^{cc}; si le volume de l'extrait de malt est au-dessous de 10^{cc}, on ajoute de l'eau pour arriver à ce volume. L'azote total varie avec l'extrait de malt (v. le tableau). Les essais sont faits en 3 séries durant 1, 2, 3 heures. En voici les résultats:

Les chiffres de l'azote dédoublé (en milligrammes) sont inscrits sur la Pl. VIII *a* et *b* comme ordonnées ayant pour abscisses l'extrait de malt (en centimètres cubes) et le temps (en heures). On a ainsi la mesure directe de l'action de la même quantité d'extrait de malt (autrement d'enzyme) pendant les temps différents, ou bien celle de l'extension de la protéolyse en employant, pendant le même temps, des quantités différentes d'extrait de malt.

¹⁾ V. Schmidt und Weis: Die Bakterien, Jena 1902, p. 152 ss.

	31 ^{mg.74} d'Az-protéine	Az total	Az des liquides filtrés				Az dédoublé		
			pour com- mencer	au bout de 1 heure	au bout de 2 heures	au bout de 3 heures	au bout de 1 heure	au bout de 2 heures	au bout de 3 heures
		mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
0 ^{cc} d'extrait de malt à 0 ^{mg.00} d'Az		31.74	1.64	1.64	1.64	1.64	0.00	0.00	0.00
2 ^{cc} — — — 3 ^{mg.71} —		35.45	4.12	9.32	10.84	12.00	5.20	6.72	7.88
4 ^{cc} — — — 7 ^{mg.40} —		39.14	6.60	18.96	22.04	24.16	12.36	15.44	17.56
6 ^{cc} — — — 11 ^{mg.10} —		41.84	9.08	27.68	32.56	34.36	18.60	23.48	25.28
8 ^{cc} — — — 14 ^{mg.80} —		46.54	11.56	35.44	38.84	39.68	23.88	27.28	28.12
10 ^{cc} — — — 18 ^{mg.54} —		50.28	14.06	42.08	43.28	43.32	28.02	29.22	29.26

Si on examine la Pl. VIII *a* on trouvera que les actions, pendant la première heure, sont presque proportionnelles aux quantités d'enzyme aussi loin qu'à 10^{cc}; mais pendant la deuxième heure, la proportionnalité ne se maintient que jusqu'à 6^{cc}; il en est de même, à peu près, pendant la troisième heure. Avec 10^{cc} le maximum d'action s'atteint au bout de la première heure, à peu près. L'action ne va pas plus loin en 3 qu'en 2 heures, vu qu'il n'y a plus de protéine à dédoubler. Avec 8^{cc} d'extrait de malt, la quantité d'azote dédoublée en 3 heures est tout juste égale à celle qui, avec 10^{cc}, est dédoublée en 1 heure. — La Pl. VIII *b* fait voir que l'action de n'importe quelle quantité d'enzyme est beaucoup plus forte pendant la première que pendant la deuxième et la troisième heure et que, pour les petites quantités d'enzyme (2^{cc} et 4^{cc}), ce fait ne s'explique pas par le manque de matières fermentescibles. Ce n'est qu'avec 10^{cc} et 8^{cc} que la réaction peut être considérée comme terminée au courant des trois heures (avec 10^{cc} déjà au bout de 2 heures). Avec 6^{cc}, il ne reste qu'un petit peu pour que la réaction se termine. Avec 4^{cc}, elle pourrait peut-être se terminer au courant de 4—5 heures. Avec 2^{cc}, il lui faudrait un temps beaucoup plus long, si tant est qu'elle arrive jamais à son terme.

Si, au moyen de ces résultats, on cherche à répondre aux questions posées à la page 196, il faudra regretter tout d'abord que les temps n'aient pas été plus étendus. On voit, sans doute, qu'au-dedans d'un temps donné une quantité de ferment plus grande (10^{cc}) ne mène pas le dédoublement plus loin qu'une quantité moins grande (8^{cc}). Les essais, cependant, ne répondent pas directement à la question de savoir si les petites quantités de ferment (2^{cc} et 4^{cc}) auraient pu mener la réaction au même point. Si j'avais opéré avec une concentration de protéine plus forte (comp. les essais p. 199) mes courbes auraient eu, sans doute, la même forme, essentiellement, qu'elles ont maintenant, montant, cependant, un peu plus haut pour les quantités d'enzyme plus grandes.

Elles auraient, probablement, fait le parcours, à peu près, que font les courbes qu'a trouvées Kjeldahl pour les actions de quantités de diastase différentes pendant des temps différents. Seulement, elles n'auraient pas une tendance aussi prononcée à courir parallèlement à l'axe des abscisses au-dedans des temps employés, quoique mes essais s'étendent sur un temps plus de trois fois aussi long que celui de Kjeldahl¹⁾ (comp., par exemple, les essais plus bas (p. 199) sur l'action de 10^{cc} d'extrait de malt sur une solution de protéine à 5 p. c. pendant 48 heures et au-dessous).

7. Dépendance du temps à des concentrations de protéine différentes.

Pendant plusieurs des essais nommés, entre autres pendant ceux auxquels on examine l'influence du temps sur la protéolyse au moyen de précipitants (VI^e Série, essais 1711—1776, v. p. 189), on est arrivé assez vite ou, en tout cas, au bout de quelques heures, à l'action maxima de la phase de la protéolyse (formation d'albumoses, action de la peptase) qui peut être déterminée par la précipitation par le chlorure stanneux. Il ne reste qu'un tout petit peu d'azote non attaqué, qui peut provenir tout entier du contenu de matières albuminoïdes de l'extrait de malt même, tandis que toute la protéine, ou à peu près, est dédoublée. Alors se pose la question si, en opérant avec des concentrations de protéine plus fortes, on pourrait conduire la réaction proportionnellement aussi loin, ou si elle s'arrêterait à un point déterminé, indépendamment de la protéine restée au liquide d'essai; ou encore si, pour un temps déterminé, une certaine quantité d'extrait de malt (d'enzyme) ne pourrait dédoubler, avant que la réaction eût atteint son maximum, qu'une quantité déterminée de matières albuminoïdes, ou enfin si son pouvoir fermentatif était proportionnel à la quantité de matières fermentescibles présentes au commencement de l'essai. Enfin, il importe de connaître le pouvoir fermentatif maximum d'un extrait de malt.

J'ai donc fait une série d'essais aux conditions identiques, autant que possible, à celles des essais nos. 1711—1776 (v. p. 189), si ce n'est que j'ai opéré avec des concentrations plus fortes ($2\frac{1}{2}$ et 5 p. c.) de protéine. J'ai, naturellement, dû me servir d'un autre extrait de malt. Mais contenant la même quantité d'azote, à peu près, il a dû posséder, approximativement, le même pouvoir fermentatif. On est donc en droit de comparer tous ces essais, ainsi qu'on a fait dans le

¹⁾ V. ces Comptes-rendus I, 145 (1879).

1 p. c. de protéine (nos. 1711—1776).	2 1/2 p. c. de protéine (nos. 2261—2310).	5 p. c. de protéine (nos. 2261—2310).
En 10 ^{cc} d'extrait de malt 18 ^{mg} 34 d'Az total	En 10 ^{cc} d'extrait de malt 19 ^{mg} 14 d'Az total	En 10 ^{cc} d'extrait de malt 19 ^{mg} 14 d'Az total
— — de solut. de prot. 31 ^{mg} 46 —	— — de solut. de prot. 78 ^{mg} 86 —	— — de solut. de prot. 141 ^{mg} 20 —
Total 50 ^{mg} 30 d'Az total	Total 97 ^{mg} 99 d'Az total	Total 163 ^{mg} 34 d'Az total

nombre d'heures	Az du liquide filtré du calchure stanneux		Az du liquide filtré de l'acide tanannique		Az du liquide filtré du calchure stanneux		Az du liquide filtré de l'acide tanannique		Az du liquide filtré de l'acide tanannique	
	p. c. d'Az		p. c. d'Az		p. c. d'Az		p. c. d'Az		p. c. d'Az	
	Az dédoublé	total	Az dédoublé	total	Az dédoublé	total	Az dédoublé	total	Az dédoublé	total
0	15.62	31.1	10.48	20.8	14.44	14.7	9.90	10.1	15.28	9.4
1	40.40	80.3	16.96	33.7	57.0	58.2	—	—	62.6	38.3
2	42.36	84.2	21.16	42.1	68.4	69.8	24.4	24.9	78.7	48.2
3	43.76	87.0	23.52	46.8	71.4	72.9	—	—	90.0	55.5
4	43.72	86.9	24.80	49.3	74.4	75.9	—	—	94.1	57.6
5	43.76	87.0	25.80	51.3	77.2	78.8	32.4	33.1	96.3	59.0
6	44.68	88.8	27.04	53.8	78.6	80.2	—	—	101.6	62.2
9	45.16	89.8	31.16	61.9	82.6	84.3	—	—	111.6	68.3
12	45.28	90.0	34.96	69.5	83.4	85.1	46.0	46.9	117.0	71.6
24 (45.76)		(91.0)	38.04	75.6	84.8	86.5	56.4	57.6	127.4	78.0
48	46.32	90.1	41.08	81.7	86.8	88.6	64.0	65.3	140.0	85.7

tableau p. 199. Pour le faire bien comprendre, voici quelques observations sur le mode d'expérimentation, surtout sur les précipitations et les dosages d'azote de ces essais nouveaux.

Essais nos. 2261—2310. On prépare deux solutions d'environ 5 et 10 p. c. de protéine dans de l'acide lactique à 0.4 p. c. Après avoir été chauffées au bain-marie pendant peu de temps, les deux solutions sont parfaitement claires. En mélangeant avec des volumes égaux d'extraits de malt, les concentrations de protéine seront de $2\frac{1}{2}$ et de 5 p. c., à peu près. Voir le tableau pour la teneur en azote des solutions et de l'extrait de malt. Pour s'assurer d'une précipitation complète et pour n'avoir pas des quantités d'azote trop grandes à manier, on n'opère qu'avec 5^{cc} de solution de protéine + 5^{cc} d'extrait de malt. Le mélange est porté dans des fioles jaugées de 50^{cc}, bouchées de bouchons de liège pendant toute la durée des essais. On précipite par le chlorure stanneux et par l'acide tannique. On emploie 30^{cc} du chlorure de la force¹⁾ ordinaire + 10^{cc} de chlorure de calcium. Du tannin, on emploie 20^{cc} qu'on remplit d'eau (20^{cc}) jusqu'au trait. Pour doser l'azote, on emploie aux essais de contrôle (auxquels la précipitation se fait tout de suite) 25^{cc} du liquide filtré, mais aux essais actifs, contenant de l'azote dédoublé, 10^{cc} seulement du liquide filtré. On calcule l'azote trouvé pour 10^{cc} de solution de protéine + 10^{cc} d'extrait de malt en multipliant par 4 et par 10. — La température est de 50°. On ne se sert d'aucun antiseptique, la température élevée ainsi que l'acide lactique entravant le développement de bactéries. En effet, au bout de 48 heures le liquide sent tout frais, n'offrant aucun signe d'infection.

Pour constater incontestablement que ce n'est pas une action sur la protéine (transformée en syntonines, etc.) de l'acide lactique, mais bien les actions d'enzyme qui causent la manière de se comporter changée de cette substance à l'égard des précipitants, particulièrement du chlorure stanneux, on a fait quelques essais témoins, auxquels 5^{cc} de chaque solution de protéine reste, pendant 24 heures, à 50°, additionnée de 5^{cc} d'eau au lieu d'extrait de malt. Voici les résultats de dosages d'azote faits en 25^{cc} des liquides filtrés (50^{cc} en tout) provenant de la précipitation par le chlorure stanneux :

¹⁾ Suivant Schjerning (Zeitschr. f. anal. Chemie XXXV, 287 et XXXVI 651) 1^{mg} d'azote demande, pour être précipité, 1^{cc} de chlorure stanneux. Dans ce cas, 30^{cc} ne suffiront pas dans tous mes essais. Mais le fait est que la protéine non attaquée est précipitée par l'acide chlorhydrique fort de la solution de ce chlorure dans lequel la protéine est insoluble. Cette précipitation se fait quantitativement entre certaines limites.

	Az du liquide filtré	
	au commencement	au bout de 24 heures à 50°
2 ¹ / ₂ p. c. de solution de protéine	1 mg.28	1 mg.08
5 — — —	2 mg.20	1 mg.76

Les résultats montrés au tableau p. 199 étaient pour moi une révélation pleine de surprise; ils le seront peut-être aussi pour d'autres. En effet, si on considère que l'orge en germination contient des enzymes douées de propriétés protéolytiques tellement puissantes, il est presque incompréhensible qu'elles aient pu si longtemps échapper à l'attention des savants, d'autant plus que ce grand pouvoir fermentatif appartient, non pas seulement à l'enzyme pepsique mais encore à l'enzyme trypsique. Aux essais à 5 p. c. de protéine le dédoublement est tellement intensif qu'il ne le cède guère à la fermentation la plus vive changeant le sucre en alcool et en acide carbonique. C'est seulement parce qu'elle n'est accompagnée ni de dégagement de gaz ni de formation de matières odorantes que la protéolyse ne se fait pas directement connaître. Ce ne sont que les précipitations suivies de dosages d'azote aux précipités ou aux produits filtrés, opérations qui demandent quelques jours pour s'accomplir, qui nous apprennent qu'en général il se passe quelque chose.

Si on examine de plus près les résultats des essais, c'est en se rapportant aux représentations graphiques, comme aux Pls. IX et X, qu'on en a le plus facilement un aperçu. Les chiffres du tableau permettent la construction de bien des systèmes de courbes, et des conclusions nombreuses. Je me bornerai ici à attirer l'attention sur ce que nous apprennent les planches. Sur la première (Pl. IX), les résultats se trouvent exprimés d'après les chiffres directement trouvés: les ordonnées indiquent la quantité d'azote, exprimée en milligrammes, qui se soustrait au précipitant au bout des différents temps, marqués sur l'axe des abscisses; les lignes droites expriment la quantité d'azote total des différentes concentrations. Sur la seconde planche (Pl. X), les ordonnées indiquent la quantité, pour 100, d'azote total qui est dédoublée au bout des différents temps.

On voit donc que la quantité d'enzyme, tant pepsique que trypsique, qui se trouve en 10^{cc} d'extrait de malt, est à même de dédoubler, dans les limites des temps employés, beaucoup plus d'azote que celui qui se trouve en 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c. + 10^{cc} d'extrait de malt. Si, dans ce dernier cas, la courbe de chlorure stanneux passe, après si peu de temps, parallèlement à l'axe des abscisses, ce n'est que parce que la matière fermentescible vient à manquer. Même à la première heure, la formation d'albumoses va en croissant

avec la concentration de la protéine au-delà de $2\frac{1}{2}$ p. c. Il en est de même pour l'action donnant naissance à des corps amidés, surtout au bout de deux heures, malgré le grand nombre d'albumoses qui existent encore dans la solution à 1 p. c. Cependant l'accroissement de $2\frac{1}{2}$ p. c. à 5 p. c. étant assez faible, il est probable qu'une concentration intermédiaire donnera l'action maxima. Une comparaison avec des essais traités plus haut (p. 185) fait supposer que cette concentration sera d'environ 3—4 p. c. Au bout de 48 heures, la formation d'albumoses à la solution de protéine à $2\frac{1}{2}$ p. c. est à peu près aussi avancée, pour cent d'azote, qu'à la solution à 1 p. c.; à la solution à 5 p. c. elle n'est pas loin d'être arrivée au même point¹⁾. Tout porte à croire que si on avait prolongé le temps des essais, les trois courbes de chlorure stanneux de la Pl. X se seraient coupées les unes les autres. — Le dédoublement plus profond, l'activité trypsique, s'opère, sans doute, avec plus de lenteur l'enzyme actif ayant ici, à ce qu'il faut croire, comme matériaux de fermentation les albumoses et les peptones formées par l'autre enzyme²⁾. Mais les chiffres et les courbes nous montrent bien clairement que le dédoublement a une extension considérable aussi quantitativement. Ainsi on voit qu'au bout de 48 heures il y a aux trois concentrations 41^{mg}.08, 64^{mg}.0, 83^{mg}.0 d'azote ou 81^{mg}.7, 65^{mg}.3, 50^{mg}.8 p. c. de l'azote total qui sont dédoublés en corps imprécipitables par l'acide tannique. Il n'y a pas de doute qu'un temps d'essai plus étendu n'eût donné des chiffres plus élevés, puisque toutes les courbes continuent de monter entre 24 et 48 heures. — Dans la solution de protéine à 5 p. c. la courbe de chlorure stanneux et la courbe de tannin sont presque parallèles pendant tout le temps d'essai, en d'autres mots l'activité pepsique et la trypsique se sont faites avec une intensité presque égale, ce qui semble indiquer que celle-ci dépend de celle-là.

Rien dans les essais ne porte à croire que l'entassement des produits de fermentation ait retardé sensiblement l'action des enzymes. La lenteur successive de celle-ci ne s'explique que par la diminution de la matière fermentescible. Il est vrai que les produits formés par l'enzyme pepsique (les albumoses et les peptones) s'écartent peu à peu l'enzyme trypsique continuant leur dédoublement, mais bien avant que ce dédoublement se manifeste d'une façon sensible la formation d'al-

¹⁾ Ceci sauterait aux yeux beaucoup plus si on dressait la courbe du dédoublement de la protéine seule.

²⁾ Peut-être aussi est-elle à même de former elle même des albumoses et des peptones en dédoublant des matières albuminoïdes comme le fait, d'après ce qu'on pense, la trypsine animale; à moins que là aussi il ne s'agisse de deux enzymes.

bumoses, aux essais à 1 p. c. de protéine, a atteint son maximum, au bout de 3—6 heures, tandis que tout accroissement ultérieur, causé par l'écartement de quantités de plus en plus grandes des albumoses, est hors de question. Lorsque, comme c'est le cas pour les essais à 5 p. c. de protéine, les matériaux de fermentation se présentent en quantité à la tryptase, l'activité de celle-ci ne semble pas retardée par l'entassement des produits de fermentation qu'elle forme elle-même.

Si on compare ces essais avec ceux traités plus haut, à la p. 197, ceux, surtout, auxquels on se sert de 2^{cc} d'extrait de malt, il en résulte encore que la concentration de protéine joue un rôle important pour l'étendue du dédoublement. Les 2^{cc} d'extrait de malt sont loin, dans la solution de protéine à 1 p. c., de dédoubler autant, relativement, que le font ici les 10^{cc} dans la solution à 5 p. c. Aussi peut-on être sûr que 2^{cc} auraient dédoublé beaucoup plus dans une solution à 5 p. c. que dans une solution à 1 p. c., pendant le même temps.

Enfin, malgré la force de la concentration de protéine par rapport à la quantité de ferment, et malgré l'étendue du temps (48 heures), il paraît qu'on n'a pas atteint le point où 10^{cc} d'extrait de malt ne pourront pas dédoubler plus d'azote pourvu qu'on y donne le temps nécessaire, tandis que pour 100 de protéine totale le dédoublement pepsique est conduit presque au même point pour toutes les concentrations de protéine, au bout de 48 heures.

8. Dépendance de la présence de matières étrangères.

On sait que, pour certaines enzymes, l'influence sur les matières qu'elles sont à même de dédoubler, dépend de la présence d'une certaine troisième substance, ou qu'elle en est sensiblement augmentée. Ainsi la pepsine demande la présence d'un acide; la présure et la pectase exigent celle d'un sel de chaux ou d'un des autres métaux alcalino-terreux; la trypsine animale agit le plus vigoureusement à une réaction faiblement alcaline. A toutes les recherches de ferment c'est une question très importante de savoir si l'action chimique dépend d'une telle matière étrangère et, surtout, de connaître de quelle manière et à quel degré la réaction du milieu influe sur cette action.

Si, comme en ce cas-ci, on opère avec un extrait de malt qui, avec les enzymes, contient un grand nombre d'autres corps, il est très important de connaître l'influence qui s'exerce mutuellement entre les enzymes et ces corps. Il est important aussi de connaître l'influence réciproque entre les enzymes et les corps (acides, alcools etc.)

qui se forment souvent „spontanément“ pendant d'autres fermentations, par l'action de microbes sur l'extrait de malt. En suite, il est d'un grand intérêt d'éclaircir les rapports des enzymes aux substances que, dans la pratique, où il est question de l'action diastasique (par exemple, pendant le brassage), on ajoute au malt (sucres, principes amers du houblon, etc.). Il est encore d'importance de connaître l'influence des antiseptiques le plus en usage, puisqu'en étudiant une action d'enzyme il s'agit toujours d'exclure l'intervention perturbatrice des microbes. Certaines substances (les phosphates, par exemple) produisant une influence spécifique sur certaines enzymes il est naturel de les comprendre aussi dans des essais d'orientation. Enfin, il faut considérer la possibilité d'une action réciproque d'enzymes se trouvant au même extrait (par exemple, elles peuvent se détruire les unes les autres). Il se présente donc une foule de questions qui demanderaient à être examinées.

Du nombre j'ai choisi quelques-unes parmi celles qui portent le plus sur mon sujet, examinant, provisoirement, l'influence d'acides, de bases, de l'alcool, de quelques antiseptiques. Et même, pour la plupart des cas, je me suis borné à examiner leur influence sur l'enzyme trypsique, m'étant servi le plus souvent, comme précipitant, du tannin auquel j'ai ajouté, dans quelques cas, le chlorure stanneux.

Ce qui présente le plus d'intérêt, ce serait de connaître la marche de la protéolyse dans l'absence de ces matières¹⁾ ou, du moins, d'acides et de bases, c'est à dire, à réaction neutre du milieu. Si je n'ai aucun essai direct en milieu neutre à présenter c'est que les matières albuminoïdes avec lesquelles j'ai opéré, étaient insolubles dans l'eau, et que je n'ai pas examiné leur solubilité dans les solutions salines neutres (sel de cuisine). Pour les essais d'autodigestion seuls, dont j'ai fait une série sans additionnement d'acide, on pourra peut-être parler d'essais faits en milieu neutre; mais encore est-ce matière à discussion: en effet, on sait qu'un extrait de malt réagit acide sur nos indicateurs ordinaires (teinture de tournesol, phénol-phtaléine, et d'autres); ainsi pour la neutralisation de 10^{cc} de l'extrait que j'ai préparé il faudra 1^{cc}.25—3^{cc}.0 de solution d'hydrate de sodium normale au 1/10. Mais les savants qui ont particulièrement examiné cette question (Ad. Ott²⁾, Eug. Prior³⁾, et d'autres) ne sont pas d'accord, les uns attri-

¹⁾ Naturellement, il n'y a pas moyen d'éviter des matières étrangères, tant qu'on n'aura pas produit les enzymes à l'état pur.

²⁾ Ad. Ott: Zeitschr. f. d. gesammte Brauwesen XX, 633—36 (1897).

³⁾ Eug. Prior: Bayrisches Brauer-Journal VIII nos. 31—36 (1898).

buant l'acidité à des sels acides, surtout à des phosphates primaires, les autres à des acides libres.

Cependant, les essais que je vais décrire donnent des indications qui permettent de juger de l'influence plus ou moins favorable qu'exerce sur la protéolyse la réaction neutre. En effet, l'action a toujours été extrêmement faible aux concentrations d'acide les plus faibles que j'aie pu obtenir. J'ose donc émettre la supposition qu'à réaction neutre du liquide ces enzymes n'ont qu'une action très faible sur les matières albuminoïdes examinées par moi.

Acides et bases.

Parmi les acides, j'ai examiné les deux acides organiques les plus répandus dans la pratique et qui peuvent jouer un rôle dans la fabrication de la bière: l'acide lactique et l'acide acétique. A titre de comparaison j'ai opéré aussi avec deux acides minéraux: l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique, et avec deux bases: l'hydrate et le carbonate neutre d'un métal alcalin. A part l'acide lactique, j'ai, dans mes essais, opéré avec des liqueurs normales. Mais comme les extraits de malt des différentes séries varient entr'eux et qu'aux essais des bases je me suis, en partie, servi d'une autre substance protéique, les chiffres trouvés ne donnent pas la mesure directe de l'influence du corps examiné. Le plus souvent, lorsque l'essai portait sur un autre acide ou sur une base, j'ai fait des essais comparatifs avec une solution aqueuse d'acide lactique à 0.2 p. c.

En quelques cas j'ai suivi l'influence de l'augmentation de l'acide sur l'autodigestion de l'extrait de malt. Généralement, j'ai encore examiné l'influence de l'acide ou de la base sur la protéine seule, sans addition d'extrait de malt, toujours remplissant d'eau jusqu'à 20^{cc}.

Il y a toujours, au moins en descendant, eu des limites naturelles aux concentrations des acides et des alcalis se prêtant à des expériences. En effet, j'étais toujours obligé de commencer par dissoudre la substance protéique dans les liquides, et, par conséquent, sa solubilité plus ou moins grande doit être prise en considération. Nous avons dit (p. 154) que la protéine de froment (et il en est de même de la légumine) est insoluble ou très peu soluble dans l'eau, et qu'il existe une concentration minima d'acide ou d'alcali à laquelle les 2 p. c. de protéine se dissolvent complètement. Pourtant des essais au-dessous de cette limite minima et auxquels, par conséquent, la concentration de protéine était plus faible, ont été faits et enregistrés. Quant à l'acide lactique, à l'acide acétique, aux alcalis, la solubilité de la protéine augmente avec la concentration de ces matières, tandis qu'elle décroît

de nouveau très vite pour l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique, aussitôt que le liquide aura pris une certaine acidité très faible (v. p. 154).

Aux essais d'acide lactique, on a ajouté une solution de protéine à 2 p. c. dans l'acide lactique à 0.05 p. c., concentration la plus faible de cet acide dans laquelle les 2 p. c. de protéine étaient complètement solubles. En ajoutant le même volume d'extrait de malt on a obtenu une solution de 0.025 p. c. d'acide lactique. On a préparé les autres concentrations en ajoutant au liquide d'essai la quantité calculée d'acide lactique.

Partout ailleurs j'ai préparé des solutions de protéine à 2 p. c. dans une concentration d'acide ou de base deux fois plus forte que celle dont il fallait se servir.

Acide lactique. (Essais nos. 567—622). Les essais sont faits en 2 séries avec des extraits de malt différents. En 10^{cc} des deux extraits, il y a 7^{mg}.96 et 9^{mg}.10 d'azote qui échappent à la précipitation par le tannin. On a encore fait des essais d'autodigestion avec le premier extrait. Température: 47°. Temps: 2 heures. Précipitation par l'acide tannique seul:

				Az dédouble		de l'extrait de malt.
				de la solution de protéine + l'extrait de malt		
				I	II	I
p. m.				mg	mg	mg
0.00 = acide normal au		$1/\infty$		"	"	0.72
0.25 = —	—	$1/360$		1.98	"	0.90
0.5 = —	—	$1/180$		5.04	"	"
1.0 = —	—	$1/90$		8.40	6.62	1.90
1.5 = —	—	$1/60$		"	6.74	"
2.0 = —	—	$1/45$		8.88	7.12	"
2.5 = —	—	$1/36$		"	6.46	"
3.0 = —	—	$1/30$		"	6.40	"
3.5 = —	—	$1/25.7$		"	5.84	"
4.0 = —	—	$1/22.8$		7.04	5.64	"
5.0 = —	—	$1/18$		"	"	2.80
6.0 = —	—	$1/15$		4.20	"	"
8.0 = —	—	$1/11.2$		3.86	"	"
10.0 = —	—	$1/9$		2.56	"	1.66
15.0 = —	—	$1/6$		1.52	"	"
20.0 = —	—	$1/4.5$		1.12	"	0.70

10^{cc} de solution de protéine + 10^{cc} d'eau avec 5 p. m. d'acide lactique ne montrent, au bout de 2 heures, à 47°, aucun changement à la précipitation par l'acide tannique.

Acide acétique (Essais nos. 1009—1064). 2 heures à 47°. 2 séries avec deux extraits de malt différents contenant en 10^{cc} l'un 7^{mg}.40, l'autre 5^{mg}.52 d'azote que l'acide tannique ne précipitait pas.

				Az dédoublé de la solution de protéine + l'extrait de malt	
				I	II
p. m.				mg	mg
0.15 = acide normal	au	1/400		1.98	"
0.2 = —	—	1/300		3.02	"
0.3 = —	—	1/200		3.62	"
0.45 = —	—	1/133		4.80	"
0.6 = —	—	1/100		6.38	"
0.9 = —	—	1/66.6		7.76	"
1.5 = —	—	1/40		8.44	7.04
3.0 = —	—	1/20		9.80	7.68
4.5 = —	—	1/13.3		"	7.52
6.0 = —	—	1/10		9.18	7.20
9.0 = —	—	1/6.6		"	6.34
12.0 = —	—	1/5		"	5.20
18.0 = —	—	1/3.3		"	3.62
30.0 = —	—	1/2		"	1.98

10^{cc} de solution de protéine + 10^{cc} d'eau avec 30 p. m. (solution normale au 1/2) d'acide acétique ne changent pas au bout de 2 heures, à 47°. En 10^{cc} de solution de protéine + 10^{cc} d'extrait de malt avec de l'acide lactique à 2 p. m. 9^{mg}.22 d'azote se dédoublent au courant de 2 heures.

Acide chlorhydrique (Essais nos. 915—930). Une série, pendant 2 heures, à 47°. Des précipitations passives en 10^{cc} d'extrait + 10^{cc} de solution de protéine dans des concentrations d'acide différentes ont toutes donné le même résultat: 6^{mg}.40 d'azote se sont soustraits à la précipitation par le tannin:

				Az dédoublé de la solution de protéine + l'extrait de malt	
				mg	
acide normal	au	1/3000 = 0.018	p. m. HCl	0.92
—	—	1/800 = 0.045	—	1.08
—	—	1/400 = 0.09	—	1.84
—	—	1/200 = 0.18	—	5.24
—	—	1/100 = 0.36	—	8.66
—	—	1/50 = 0.72	—	2.96
—	—	1/20 = 1.80	—	0.52

Dans un essai parallèle avec de l'acide lactique à 0.2 p. c., il y a eu, pendant le même temps, dédoublement de 8^{mg}.12 d'azote.

Acide sulfurique (Essais nos. 1065—1086). L'extrait de malt contient, en 10^{cc}, 5^{mg}.42 d'azote non précipitable par le tannin:

				Az dédoublé de la solution de protéine + l'extrait de malt	
				mg	
acide normal au	$1/2000 = 0.024$	p. m. H^2SO^4	0.94	
—	$1/800 = 0.06$	—	—	1.38
—	$1/400 = 0.12$	—	—	2.10
—	$1/200 = 0.24$	—	—	4.42
—	$1/150 = 0.33$	—	—	5.48
—	$1/100 = 0.49$	—	—	7.14
—	$1/75 = 0.65$	—	—	5.10
—	$1/50 = 0.98$	—	—	0.06

Hydrate de sodium. Différentes séries d'essais à des temps différents et, par conséquent, avec des extraits de malt différents. La marche des essais variant pour les différentes séries, je vais traiter chaque série à part.

1^{re} Série (Essais nos. 1103—1119). En 10^{cc}, l'extrait de malt contient 7^{mg}.86 d'azote non précipitable par l'acide tannique. On en dose l'acidité (la teneur en sels acides + acides libres éventuels) en titrant par une solution normale d'hydrate de sodium au $1/10$, prenant comme indicateurs des papiers de tournesol et de curcuma. Abstraction faite de la valeur de cette méthode pour la détermination d'acide vraiment libre, elle fournit, telle qu'elle est appliquée ici, une mesure relative de l'acidité. Pour la neutralisation, 10^{cc} d'extrait de malt ont demandé $\left\{ \begin{smallmatrix} 2^{cc.04} \\ 2^{cc.02} \end{smallmatrix} \right\} = 2^{cc.03}$ de solution normale d'hydrate de sodium au $1/10$. On prépare des solutions d'hydrate de sodium contenant:

- 1) 20^{cc} de NaOH normal au $1/10$ pour 100^{cc} = NaOH normal au $1/50$
- 2) 21^{cc} - — — — —
- 3) 22^{cc} - — — — —
- 4) 23^{cc} - — — — —
- 5) 24^{cc} - — — — —
- 6) 25^{cc} - — — — — = NaOH normal au $1/40$

Dans 25^{cc} de chacune de ces solutions on a dissous à froid, en les mettant dans l'armoire glacière, 0^{gr}.5 de protéine. Sauf à la première, 10^{cc} de ces solutions devaient contenir un petit excès d'alcali

libre après avoir neutralisé 10^{cc} de l'extrait de malt. En effet, tous les mélanges ont réagi alcalin avec les papiers de tournesol et de curcuma.

10^{cc} du même extrait de malt, ajoutés à 10^{cc} de solution de protéine dans de l'acide lactique à 0.2 p. c., ont dédoublé, au bout de 2 heures, à 47°, 8^{mg}.18 d'azote les rendant imprécipitables par l'acide tannique.

Au bout du même temps les essais donnent:

					Azote dédoublé milligramme
avec 20 ^{cc} de Na OH normal au $\frac{1}{10}$	par	100 ^{cc}	0.47	
— 21 ^{cc}	—	—	—	0.44
— 22 ^{cc}	—	—	—	0.96
— 24 ^{cc}	—	—	—	0.40
— 25 ^{cc}	—	—	—	0.58

II^e Série (Essais nos. 1669—1710). Avant de servir, l'extrait de malt est neutralisé, mais par un procédé différent de celui de la série précédente. Par suite d'une préparation particulière (on digère 700^{gr} de malt avec 700^{gr} d'eau; on filtre; le lendemain, on digère de nouveau avec 230^{gr} d'eau; après filtration nouvelle, on mélange les deux filtrats) il est extrêmement riche en azote, contenant, avant la neutralisation, 23^{gr}.84 d'azote par 10^{cc}, dont 12^{gr}.08 échappent à la précipitation par l'acide tannique. A la neutralisation on se sert, comme indicateur, de phénol-phtaléine, à laquelle les phosphates primaires sont acides et les phosphates secondaires sont alcalins. Ayant trouvé qu'il faut 2^{cc}.85 d'hydrate de sodium normal au $\frac{1}{10}$ pour la neutralisation de 10^{cc} d'extrait de malt avant de produire une teinte rouge sensible avec de la phénol-phtaléine, on a, pour éviter une dilution trop grande, neutralisé par de l'hydrate de sodium normal au $\frac{2}{1}$ en en ajoutant 4^{cc}.25 à 300^{cc} d'extrait de malt. Dans ces conditions, un échantillon de celui-ci a donné, par l'addition de phénol-phtaléine, une teinte rouge tout justement sensible; en ajoutant encore une goutte d'hydrate de sodium au $\frac{1}{10}$, le liquide a pris une coloration fortement rouge. A la neutralisation il s'est formé un précipité volumineux. Après filtration, on l'a digéré avec de l'eau faiblement acidulée d'acide lactique (2 p. m. d'acide lactique, à peu près) pour l'examiner à part dans le but de constater s'il possédait du pouvoir fermentatif protéolytique. En 10^{cc}, l'extrait de malt neutralisé contient 23^{mg}.12 d'azote total dont 11^{mg}.76 échappant à la précipitation par l'acide tannique.

Ici il s'est présenté un inconvénient à l'emploi de la protéine de froment: celle-ci n'est que très peu soluble dans les concentrations d'alcali, soumises à l'examen. En effet, j'ai désiré me servir de concentrations

équivalentes aux concentrations correspondantes d'acides minéraux, acide chlorhydrique et acide sulfurique, qui font l'objet des essais précédents (v. p. 207—08). J'ai donc choisi une autre matière protéique, la *légumine*, qui s'est montrée un peu plus soluble, sachant, grâce à une série particulière d'essais (v. IV, 3), qu'elle est susceptible d'une action vigoureuse de l'extrait de malt en solution acide. On a préparé différentes solutions de légumine à 2 p. c. dans des solutions d'hydrate de sodium de concentrations différentes: des solutions normales au $1/800$, au $1/400$, au $1/200$, au $1/100$, au $1/75$, au $1/50$, au $1/30$, au $1/10$. Pour accélérer la solution, on chauffe au bain-marie pendant une heure. La légumine ne se dissolvant pas complètement dans les six premières concentrations, leur teneur en azote est moins forte que celle des solutions suivantes, tout en augmentant avec les concentrations d'hydrate de sodium. On sépare la matière indissoute par filtration. Les trois dernières solutions avaient une teinte jaunâtre. Par le mélange avec des volumes égaux d'extrait de malt, les concentrations d'hydrate de sodium sont réduites de moitié donnant des solutions normales au $1/1600$, au $1/800$, etc. — A titre de comparaison on a fait des essais sur l'influence de l'extrait de malt sur une solution de légumine acidulée d'acide lactique (à 2 p. m. d'acide lactique); mais en mêlant les deux liquides, une partie de la légumine s'est précipitée. — L'acide tannique a servi de précipitant. On a fait des précipitations passives dans des mélanges de 10^{cc} d'extrait de malt et 10^{cc} des solutions suivantes: 1° de la légumine dans de l'acide lactique à 0.2 p. c.; 2° de la légumine dans de l'hydrate de sodium normal au $1/800$; 3° de la légumine dans de l'hydrate de sodium normal au $1/300$. Les liquides filtrés en contenaient $11^{\text{mg.}}54$, $11^{\text{mg.}}08$, $10^{\text{mg.}}84$ d'azote. Température 47° . Temps d'essai 2 heures. En voici les résultats:

										Az dédoublé milligrammes
10 ^{cc} de malt + 10 ^{cc} de légumine dans de l'ac. lactique à 2 p.m. donnent										12.44
—	—	—	—	—	du NaOH normal au $1/1600$				—	1.28
—	—	—	—	—	—	—	—	—	$1/800$	1.48
—	—	—	—	—	—	—	—	—	$1/400$	1.58
—	—	—	—	—	—	—	—	—	$1/200$	1.60
—	—	—	—	—	—	—	—	—	$1/150$	1.54
—	—	—	—	—	—	—	—	—	$1/100$	1.16
—	—	—	—	—	—	—	—	—	$1/40$	(6.72)
—	—	—	—	—	—	—	—	—	$1/20$	(12.80)

On a trouvé les chiffres de l'azote dédoublé en déduisant des quantités d'azote trouvées aux liquides filtrés des essais actifs $10^{\text{mg.}}96$, moyenne

des deux précipitations passives, nommées plus haut. Les chiffres élevés des deux derniers essais avec l'hydrate de sodium normal au $\frac{1}{40}$ et au $\frac{1}{30}$ s'expliquent, sans doute, par le dédoublement de la légumine sous l'influence des concentrations fortes alcalines. Ce dédoublement, qui a lieu probablement déjà pendant le chauffage, fait qu'une grande partie de la légumine échappe à la précipitation par le tannin. Probablement il n'y pas d'action d'enzyme du tout, mais c'est là un point sur lequel ces essais ne permettent aucune conclusion sûre. Les résultats des autres essais nous montrent clairement que la présence de petites quantités d'alcali libre cause l'affaiblissement prononcé, peut-être la destruction complète du pouvoir fermentatif. Pour s'éclaircir sur la nature de cette influence, et pour apprendre si l'hydrate de sodium détruit l'enzyme ou s'il ne fait qu'en entraver l'action, on a fait, avec le même extrait de malt, les essais suivants:

1° Avec l'extrait de malt sans neutralisation contenant 23^{mg}.84 d'azote et qu'on fait agir sur une solution de légumine dans de l'acide lactique. Au bout de 2 heures, à la température de 47°, 18^{mg}.28 d'azote se sont dédoublés.

2° Avec l'extrait de malt neutralisé provisoirement (indicateur: de la phénol-phtaléine) par l'hydrate de sodium à réaction faiblement alcaline, mais rendu acide, tout de suite après, au moyen de la quantité d'acide lactique correspondant à l'hydrate de sodium additionné. Sous son action, 15^{mg}.58 d'azote d'une solution de légumine dans de l'acide lactique se sont dédoublés.

3° Avec l'extrait de malt neutralisé la veille et placé, jusqu'au moment de s'en servir, dans l'armoire glacière. On y ajoute de l'acide lactique en quantité correspondante à l'hydrate de sodium additionné. Sous son action 11^{mg}.44 d'azote d'une solution de légumine dans de l'acide lactique se sont dédoublés.

4° Avec l'extrait à acide lactique du précipité (v. p. 209) formé à la neutralisation de l'extrait de malt. En 10^{cc} de cette eau il y avait 2^{mg}.25 d'azote total. En la faisant agir sur une solution de légumine dans de l'acide lactique on a obtenu 1^{mg}.00 d'azote dédoublé.

Il résulte de ces essais que la neutralisation provisoire d'un extrait de malt, tout en affaiblissant son pouvoir fermentatif trypsique, est loin de le détruire; qu'après 24 heures de neutralisation le pouvoir fermentatif s'est affaibli ultérieurement, mais qu'il est toujours assez vigoureux si on rétablit la réaction acide; enfin, que le précipité formé à la neutralisation et qui consiste essentiellement en phosphates, entraîne une substance douée d'un pouvoir fermentatif faible, ce qui contribue

à l'affaiblissement du pouvoir fermentatif de l'extrait de malt qu'on constate à la neutralisation.

III^e Série (Essais nos. 2091—2099, 2109—2122, 2135—2144).

On neutralise l'extrait de malt comme à la série précédente se servant, comme indicateur, de la phénol-phtaléine. A un essai provisoire, pour produire la teinte rougeâtre à 10^{cc}, on emploie $\left\{ \begin{smallmatrix} 3^{cc.08} \\ 3^{cc.00} \end{smallmatrix} \right\}$ de solution d'hydrate de sodium normale au $\frac{1}{10}$. On ajoute alors à 300^{cc} d'extrait de malt 9^{cc} d'hydrate de sodium normal au $\frac{1}{1}$. Après la filtration du précipité formé, l'extrait neutralisé contient, en 10^{cc}, 18^{mg}.66 d'azote total. On prépare les solutions de légumine la veille, à froid, mais on les chauffe, avant l'essai, pendant 1 heure au bain-marie en ébullition. On réussit à obtenir une dissolution un peu plus complète de la légumine qu'à la série précédente: dans les solutions d'hydrate de sodium normales au $\frac{1}{500}$ et au $\frac{1}{200}$ seules, des quantités notables en restent indissoutes; dans l'hydrate normal au $\frac{1}{100}$ une trace¹⁾. A tous ces essais on filtre avant l'usage. On n'emploie que des solutions normales au $\frac{1}{500}$, au $\frac{1}{200}$, au $\frac{1}{100}$, au $\frac{1}{50}$, au $\frac{1}{25}$. En les mêlant avec des volumes égaux d'extraits de malt on en réduit la force de moitié (solutions normales au $\frac{1}{1000}$, au $\frac{1}{400}$, etc.).

Voici les dosages faits avant les essais (expériences passives):

10^{cc} de légumine dissous dans de l'hydrate de sodium normal au $\frac{1}{500}$ + 10^{cc} d'extrait de malt, ce qui produit une concentration de liqueur alcaline normale au $\frac{1}{1000}$, donnent, dans le liquide filtré, 15^{mg}.50 d'azote en précipitant par le chlorure stanneux, et 9^{mg}.48 en précipitant par l'acide tannique.

10^{cc} de légumine dissous dans de l'hydrate de sodium normal au $\frac{1}{100}$ contenant 31^{mg}.84 d'azote total, donnent dans le liquide filtré, après l'addition de 10^{cc} d'extrait de malt, 15^{mg}.72 d'azote en précipitant par le chlorure stanneux, et 9^{mg}.32 d'azote en précipitant par l'acide tannique.

10^{cc} de légumine dans de l'acide lactique à 0.4 p. c. + 10^{cc} d'extrait de malt neutralisé donnent, au liquide filtré, 15^{mg}.72 d'azote en précipitant par le chlorure stanneux, et 10^{mg}.00 en précipitant par l'acide tannique.

La même solution de légumine + 10^{cc} d'extrait de malt non neutralisé mais porté, par l'addition d'eau, au même volume que l'extrait neutralisé d'alcali donnent, au liquide filtré, 17^{mg}.32 d'azote à la précipitation par le chlorure stanneux, et 10^{mg}.40 d'azote par l'acide tannique.

Voici les résultats des essais actifs faits pendant 2 heures, à 50°:

¹⁾ La solubilité si différente de celle de l'autre série s'explique peut-être par l'emploi d'une autre préparation de légumine.

Azote dédoublé au liquide filtré
du chlorure stann. de l'acide tann.
milligrammes milligrammes

Extr. de malt neutralisé	+ solut. de légumine	dans Na OH norm.	au $\frac{1}{1000}$	2.17	2.36
—	—	—	$\frac{1}{400}$	4.89	2.36
—	—	—	$\frac{1}{300}$	5.55	1.96
—	—	—	$\frac{1}{100}$	4.45	1.52
—	—	—	$\frac{1}{50}$	3.73	0.44
—	—	—	de l'ac. lactique à 2 p. m.	9.02	7.30
Extr. de malt non neutralisé.	—	—	—	18.08	17.10

Carbonate de sodium neutre (Na^2CO^3). (Essais nos. 2100—2108, 2123—2134, 2145—46). On a fait ces essais en se servant du même extrait de malt qu'aux essais de la III^e Série sur l'hydrate de sodium, et parallèlement à cette série. Les solutions de légumine sont préparées de la même façon, si ce n'est qu'on emploie, comme dissolvant, le carbonate de sodium. Je pars d'une liqueur titrée normale au $\frac{1}{10} = 0.53$ p. c. Celle-ci donne, avec du nitrate d'argent, un précipité jaunâtre sans la moindre trace de nuance brunâtre, ne contenant, par conséquent, aucun hydrate de sodium libre. Pour reconnaître si la solution contient du bicarbonate de sodium (NaHCO^3), on ajoute à 10^{cc} de solution 2, 3, 4 gouttes d'une solution titrée normale d'hydrate de sodium au $\frac{1}{10}$, puis une goutte de nitrate d'argent. La teinte brune d'oxyde d'argent ne paraît qu'à l'essai des 3 gouttes d'hydrate de sodium; à l'essai des 2 gouttes, il n'y a aucune trace de nuance brunâtre. Nous mettons 10^{cc} égaux à 200 gouttes. Le carbonate neutre ne contient, par conséquent, qu'environ 1 p. c. de bicarbonate de sodium. On emploie les mêmes concentrations qu'aux essais avec l'hydrate de sodium: ainsi donc du carbonate de sodium neutre normal au $\frac{1}{500}$, au $\frac{1}{300}$, au $\frac{1}{100}$, au $\frac{1}{50}$, au $\frac{1}{25}$, au $\frac{1}{10}$, en réduisant de moitié par l'addition de l'ex-peu trait de malt au $\frac{1}{1000}$, au $\frac{1}{400}$, au $\frac{1}{300}$, etc. La légumine est ici un plus soluble que dans l'hydrate de sodium.

Voici combien on a trouvé d'azote aux liquides filtrés avant les essais (des expériences passives):

En 10^{cc} de solution de légumine dans Na^2CO^3 normal au $\frac{1}{500} + 10^{\text{cc}}$ d'extrait de malt, on a eu, dans le liquide filtré, en précipitant par le chlorure stanneux, 15^{mg}.10 d'azote, en précipitant par l'acide tannique, 9^{mg}.36 d'azote.

10 ^{cc} dans du Na^2CO^3 normal au $\frac{1}{100}$	contiennent	31 ^{mg} .20 d'Az total
— — — — $\frac{1}{10}$ —		33 ^{mg} .36 —

10^{cc} de solution de légumine dans du Na^2CO^3 normal au $\frac{1}{100} + 10^{\text{cc}}$ d'extrait de malt donnent, dans le liquide filtré, en précipitant par

le chlorure stanneux, 15^{mg}.04 d'azote, en précipitant par l'acide tannique, 9^{mg}.40 d'azote. Les expériences correspondantes avec du Na²CO³ normal au ¹/₁₀ donnent 16^{mg}.00 et 8^{mg}.60 d'azote (Comp. les chiffres pour le NaOH normal au ¹/₁₀, p. 213).

Pour les expériences parallèles avec les solutions de légumine dans l'acide lactique v. p. 213.

Voici les résultats des essais actifs, faits pendant 2 heures, à 50°.

Extrait de malt	solution de + légumine	dans du Na ² CO ³ norm.	au ¹ / ₁₀₀₀	Azote dédoublé au liquide filtré du chlorure stann. de l'acide tann.	
				milligrammes	milligrammes
—	—	—	—	3.65	1.98
—	—	—	—	¹ / ₄₀₀ 5.13	1.94
—	—	—	—	¹ / ₃₀₀ 4.41	1.62
—	—	—	—	¹ / ₁₀₀ 4.21	1.18
—	—	—	—	¹ / ₅₀ 4.03	0.38

Les résultats principaux obtenus aux essais sur l'influence des acides et des alcalis sur la protéolyse, sont montrés graphiquement au moyen des courbes de la planche XI. Les abscisses indiquent les concentrations des différentes substances, exprimées en solutions titrées normales (millièmes de grammes-équivalents par litre), et les ordonnées la quantité d'azote en milligrammes qui s'est soustraite, pendant le temps de l'essai, 2 heures, à la précipitation par l'acide tannique, à la température optima de 47°. On pourra dresser des courbes pareilles pour l'activité que révèle la précipitation par le chlorure stanneux, mais ce n'est que par exception que mes essais ont été poussés aussi loin. — Il faut, cependant, accentuer, ce que j'ai dit plus haut, que les courbes, rapprochées sur la Pl. XI, ne sont pas directement comparables, en tant qu'elles expriment les résultats d'essais faits avec des extraits de malt divers et, en partie, avec des matières albuminoïdes diverses. On ne peut donc pas conclure de la place plus élevée d'une courbe que l'acide correspondant est plus favorable à la protéolyse qu'un autre acide dont la courbe se trouve plus bas.

En examinant la marche des courbes on trouve un certain accord entre les deux acides minéraux d'un côté et les deux acides organiques de l'autre, ainsi qu'un certain parallélisme entre l'action des deux alcalis. Chose frappante dans les deux premières courbes: les grandes variations de l'action sont causées par des variations insignifiantes de l'acidité. On verra qu'une petite négligence dans l'essai aura facilement pour effet de faire échapper à l'observateur l'influence de ces acides. Toutes les deux paraissent avoir atteint l'optimum quand le liquide à essayer

a une teneur en acide égale à celle d'une solution acide normale au $\frac{1}{100}$ à peu près ou, pour l'acide chlorhydrique, à environ 0.36 p. m., pour l'acide sulfurique à environ 0.49 p. m. (comp. l'effet de l'acide chlorhydrique sur la pepsine, auquel cas l'optimum est mis à 2—4 p. m.). Toute action a cessé, pour l'acide chlorhydrique, à l'acidité égale à celle d'une liqueur acide normale au $\frac{1}{20}$ (= 1.8 p. m.), pour l'acide sulfurique à l'acidité d'une liqueur acide normale au $\frac{1}{50}$ (= environ 1 p. m.).

L'optimum des deux acides organiques paraît se trouver à un point d'acidité égal à l'acidité de liqueurs acides normales au $\frac{1}{50}$ et au $\frac{1}{20}$ à peu près, c'est à dire ils ont une teneur en acide de 2 p. m. et de 3 p. m. respectivement, pour l'acide acétique sans variation notable entre 2 et 6 p. m. Mais ces substances permettent des concentrations relativement élevées, de sorte que l'action protéolytique reste sensible, pour l'acide lactique, encore à une acidité égale à celle d'une liqueur acide normale au $\frac{1}{4.5}$ (= 20 p. m.), et, pour l'acide acétique, encore à une acidité égale à celle d'une liqueur acide normale au $\frac{1}{2}$ (= 30 p. m.). Les dernières sections des courbes n'ont trouvé aucune place sur la planche, mais il sera facile de les construire sur une plus petite échelle d'après les chiffres des tableaux.

L'accroissement rapide des quatre courbes jusqu'à l'acidité d'une liqueur acide normale au $\frac{1}{100}$ est particulièrement caractéristique aux quatre acides, qui tous y montent ensemble.

Les deux alcalis semblent s'être bornés à retarder l'activité tryptique. Leur influence dans ce sens paraît s'agrandir avec la force des concentrations. Dans les concentrations les plus faibles l'enzyme a encore une action faible, mais déjà si l'alcalinité de la solution est égale à celle d'une liqueur alcaline normale au $\frac{1}{50}$, la protéolyse s'est complètement arrêtée. Cependant on constate un accroissement faible pour l'action mise à nu à la précipitation par le chlorure stanneux en allant de la liqueur alcaline normale au $\frac{1}{1000}$ à la liqueur alcaline normale au $\frac{1}{400}$ (v. les tableaux pp. 213 et 214). De là, il n'y a aucun accroissement ultérieur, mais, d'autre part, il n'y a pas non plus de descente rapide: les courbes passent presque parallèlement à l'axe des abscisses jusqu'à ce qu'on ait atteint l'alcalinité d'une liqueur alcaline normale au $\frac{1}{50}$ à peu près. En somme, la conclusion qu'il faut tirer des essais cités est la suivante: la réaction alcaline exerce un effet retardateur sur le dédoublement tryptique des deux substances albuminoïdes examinées (la protéine de froment et la légumine). D'après Windisch et Schellhorn¹⁾, elle favorise la

¹⁾ Windisch und Schellhorn: Wochenschr. f. Brauerei, XVII. Jahrg., 335 (1900).

protéolyse de substances albuminoïdes animales (la gélatine). C'est une question sur laquelle je ne me prononcerai pas. Dans un cas singulier que j'ai soumis à l'examen (l'influence sur la fibrine de bœuf dans une solution de carbonate de sodium à 0.135 p. c. (liqueur alcaline normale au $\frac{1}{40}$, à peu près)), à quelques petites traces près, il ne s'est montré, même au bout de 24 heures, ni dédoublement pepsique ni dédoublement trypsique; mais, cela va sans dire, on n'est pas en droit de généraliser en partant d'un essai isolé à une seule concentration d'alcali (v., du reste, plus loin IV, 3). —

Quoiqu'il y ait, à ce qu'il semble, une différence remarquable entre l'influence sur la protéolyse des deux acides organiques, d'un côté, et des deux acides minéraux, de l'autre, surtout après que l'action aura atteint l'optimum, il est possible, je crois, d'en donner l'explication, qui fera comprendre, en même temps, le mode d'action des alcalis, ainsi que l'ont fait Fernbach et Hubert dans leur notice déjà citée¹). Il est regrettable que ces deux auteurs ne donnent ni chiffres pour les résultats de leurs essais ni renseignements détaillés de leur procédé expérimental, se bornant à émettre les assertions suivantes, à peu près: Si un extrait de malt agit fermentativement en amenant soit la saccharification soit la protéolyse, c'est son contenu de phosphates primaires qui en accélère l'action, tandis que les phosphates secondaires la retardent. Un malt préparé à froid contient toujours un mélange de ces deux phosphates: „Or, la réaction de l'extrait de malt, acide à la phtaléine, alcaline au méthylorange est celle qu'aurait un mélange de phosphates primaire et secondaire d'un métal alcalin.“ L'addition d'acides et d'alcalis exerce son action en changeant les phosphates secondaires en phosphates primaires, et vice versa. Pour cette raison, les acides exercent un effet accélérant jusqu'à une certaine limite, tandis que les alcalis ont toujours un effet retardateur. Mais l'influence favorable des acides ne s'étend qu'au point où tout phosphate secondaire est changé en phosphate primaire, c'est à dire jusqu'à la réaction neutre au méthylorange. Toute addition ultérieure d'acide libre a un effet retardateur sur les enzymes. De même, l'addition d'alcali n'arrêtera pas toute action diastasique tant qu'il reste encore des phosphates primaires, mais elle aura une influence retardatrice en changeant ceux-ci en phosphates secondaires et en sels ordinaires. Les sels qui transforment les phosphates comme le font les acides et les bases, exerceront le même effet que ceux-ci.

Or, la différence entre les acides organiques et les acides minéraux c'est que, grâce à leur dissociation plus avancée, ces derniers ont une

¹) Fernbach et Hubert: C. r. CXXXI, 293 (1900).

action beaucoup plus énergique pour décomposer les phosphates secondaires que les premiers. Il était donc d'importance d'examiner si ces indications et les lois que j'ai trouvées pour l'influence des alcalis et des acides s'accordent entre elles. S'il en était ainsi, l'addition à un extrait de malt de la quantité d'acide assez grande pour provoquer une réaction neutre au méthylorange (c'est à dire jusqu'à ce que tous les phosphates secondaires soient changés en phosphates primaires) doit indiquer justement l'optimum de l'effet de cet acide.

J'ai donc préparé un extrait de malt comme à l'ordinaire, le titrant par de l'acide chlorhydrique normal au $\frac{1}{10}$, de l'acide sulfurique normal au $\frac{1}{7}$, de l'acide acétique normal au $\frac{1}{1}$, de l'hydrate de sodium normal au $\frac{1}{10}$. Comme indicateurs, je me suis servi du méthylorange pour les acides, et de la phénol-phtaléine pour l'alcali. Dans ces déterminations je n'ai pas visé à l'exactitude rigoureuse, qui aussi serait illusoire, vu les différences individuelles des extraits de malt par rapport aux phosphates primaires et secondaires. Mais les résultats permettent parfaitement bien d'élucider la question.

J'ai dosé 10^{cc} d'extrait de malt, additionné de quelques gouttes de méthylorange y produisant une teinte jaune-foncé, par les acides indiqués ci-dessus. Les quantités d'acides ajoutées aux différents échantillons de l'extrait étaient de 0^{cc}.5, 1^{cc}, 1^{cc}.5, 2^{cc}, 2^{cc}.5, 3^{cc}, 3^{cc}.5. J'ai cherché à déterminer la quantité à laquelle apparaît la première nuance rougeâtre, ce que, cependant, en quelques cas, on décide le mieux au bout de quelque temps de repos, après que le précipité se sera déposé. La coloration rougeâtre a apparu après l'addition de

2^{cc} d'acide chlorhydrique normal au $\frac{1}{10}$

1^{cc}.5 — sulfurique — - $\frac{1}{7}$ = 2^{cc} d'acide normal au $\frac{1}{10}$

1^{cc}.0 — acétique — - $\frac{1}{1}$ = 10^{cc} — — - $\frac{1}{10}$

Pour l'acide acétique, elle n'était pas bien distincte et, aux quantités plus fortes, les transitions n'étaient que très peu prononcées.

Pour donner à 10^{cc} d'extrait de malt, auquel on a additionné quelques gouttes de phénol-phtaléine, une nuance rougeâtre, il a fallu employer

$\left. \begin{matrix} 2^{cc}.7 \\ 2^{cc}.8 \end{matrix} \right\} = 2^{cc}.75$ de solution d'hydrate de sodium normale au $\frac{1}{10}$.

Nous voyons de ces déterminations que cet extrait de malt contenait un peu plus de phosphate primaire que de phosphate secondaire, en tout la quantité correspondant à 4^{cc}.8 de liqueur titrée normale au $\frac{1}{10}$. Pour tout changer en phosphate primaire, il fallait 2^{cc} d'acide chlorhydrique

au $\frac{1}{10}$, 2^{cc} d'acide sulfurique titré normal au $\frac{1}{10}$, et environ 10^{cc} d'acide acétique titré normal au $\frac{1}{10}$. Si on avait distribué les mêmes quantités d'acides sur 20^{cc} de liquide, les concentrations d'acide auraient été, pour les deux premiers, des acides normaux au $\frac{1}{100}$, pour l'acide acétique, l'acide normal au $\frac{1}{10}$. C'est à ces concentrations, justement, que nous trouvons l'action la plus grande, ou à peu près, de ces acides (v. Pl. IX). Au-delà de ces concentrations, l'action de l'acide chlorhydrique et de l'acide sulfurique descend rapidement, celle de l'acide acétique, au contraire, très doucement.

En ajoutant à 10^{cc} d'extrait de malt 2^{cc}.75 de liqueur d'hydrate de sodium normale, tous les phosphates primaires sont changés en secondaires. S'il fallait transformer ceux-ci en phosphates normaux, il faudrait encore ajouter 4^{cc}.8 de liqueur alcaline normale au $\frac{1}{10}$. Pour mes essais (v. p. 212, III^e série, et p. 213—14, Carbonate de sodium), je suis parti d'un extrait de malt neutralisé; par conséquent, 20^{cc} de liquide (dont 10^{cc} d'extrait de malt) contenant 4^{cc}.8 de liqueur alcaline normale au $\frac{1}{10}$ donneront au liquide l'alcalinité d'une liqueur alcaline normale au $\frac{1}{40}$ environ. Les essais font constater qu'une liqueur alcaline normale au $\frac{1}{50}$ ne produit qu'une action protéolytique très faible. Si on prolongeait les courbes, que j'ai trouvées, de l'influence de l'hydrate et du carbonate de sodium, elles couperaient l'axe des abscisses à la liqueur alcaline normale au $\frac{1}{40}$, c'est à dire là où la teneur en alcali du liquide dépasse la quantité correspondant au phosphate normal.

Considérant cet accord entre les résultats de mes essais et l'explication de Fernbach et Hubert, je ne doute pas que celle-ci ne soit essentiellement exacte, et je suis d'avis qu'elle pourra, au plus haut degré, servir à nous faire comprendre le rapport entre les actions diastatiques et les acides en général. En effet, la plupart des préparations d'enzymes contiennent, sans doute, des phosphates qui, d'après ces données, joueront un rôle très important aux actions diastatiques.

Alcool.

On prépare des solutions à 2 p. c. de protéine dans de l'alcool à 1, 3, 5, 10, 20 degrés pondéraux avec la quantité ordinaire d'acide lactique (0.4 p. c.). En ajoutant des volumes égaux d'extrait de malt, les concentrations seront réduites à 0.5, 1.5, 2.5, 5.0, 10.0 p. c. Pour empêcher que des vapeurs d'alcool ne s'échappent pendant les essais, on bouche les fioles d'un bouchon percé d'où monte un tube de verre étroit, long de 40^{cm}, fermé d'une goutte d'eau. Temps des essais: 2 heures, à la température de 47°. L'acide tannique seul sert de précipitant. Voici les résultats obtenus:

Avec 0 p. c. d'alcool	11.25	milligrammes d'Az dédoublé	} différence 3.74
— 0.5 - —	11.05	— —	
— 1.5 - —	10.65	— —	
— 2.5 - —	9.69	— —	
— 5.0 - —	7.51	— —	
— 10.0 - —	3.85	— —	
			— 3.66

Ainsi l'addition d'alcool est toujours retardatrice, et l'effet en est presque proportionnel à la quantité d'alcool. La courbe dressée au moyen des chiffres ci-dessus (Pl. XII) forme une ligne parfaitement droite; si on la prolongeait, elle couperait l'axe des abscisses à 15 p. c. d'alcool, à peu près; c'est à dire que l'enzyme cesserait, à ce point, toute action, conclusion que, naturellement, il ne faudra tirer sans contrôler par des essais directs.

Antiseptiques.

On part souvent de la supposition erronée qu'on pourra distinguer une action purement diastasique d'une action purement physiologique en ajoutant un antiseptique qui, tout en laissant intacte l'enzyme isolée de la cellule vivante, tuerait les cellules productrices de l'action physiologique. Mais souvent les substances qu'on introduit ne sont pas même des antiseptiques proprement dits. D'autre part, il y a lieu de croire que beaucoup d'enzymes sont tout aussi sensibles vis-à-vis de certains antiseptiques que la cellule vivante. Le fait est que toute généralisation est impossible ici. Tout comme il y a des poisons spécifiques pour les cellules vivantes diverses, il y en a aussi pour les enzymes diverses. Il est difficile, en ce moment, de démontrer l'existence de lois pour ces faits, de même que l'action de la plupart des poisons est énigmatique.

Les résultats négatifs auxquels arrivent quelquefois ceux qui étudient les enzymes ou qui cherchent à en démontrer l'existence, s'expliqueront, sans doute, souvent par l'emploi de quelque antiseptique qui prévient l'action de l'enzyme en question. C'est une chose que devrait noter l'enzymologie future. Dans le cas, précisément, que nous allons étudier, on aura l'exemple de la plus grande sensibilité vis-à-vis de quelques-uns des antiseptiques les plus communs aux recherches des enzymes, jointe à une impassibilité frappante en face d'autres antiseptiques.

On comprendra de ce qui précède qu'après avoir fait l'expérience de l'influence retardatrice sur quelques enzymes, j'en suis vite venu à faire mes essais de peu de durée sans addition d'antiseptique. Une observation faite par hasard m'a conduit, plus tard, à étudier particulière-

ment l'influence du toluol, et des considérations purement théoriques m'ont engagé, en partie, à faire du formol le sujet de recherches spéciales. Ce que j'ai à communiquer là-dessus est assez fragmentaire; une partie en a été publiée avant¹⁾. Cependant j'ai plusieurs observations nouvelles et non pas dépourvues d'intérêt à soumettre.

Voici ma première observation: un extrait de malt laissé, pendant 7 jours, à 0°, dans un seau à glace et saturé de thymol, dont 1 p. c. au plus est soluble, avait tout à fait perdu son pouvoir fermentatif trypsique, quoique, autrement, il fût absolument clair, et sentit bon. D'autres essais (v. p. 152) m'ont appris qu'au contraire, des extraits de malt placés de même à 0°, mais sans addition aucune, conservaient leur pouvoir fermentatif presque entier pendant le même espace de temps. J'ai alors examiné, dans une série d'essais (essais nos. 519—534) simultanés l'action de divers antiseptiques. Au bout de 2 heures, à 47°, j'ai obtenu des composés non précipitables par l'acide tannique comme suit:

				diminution
sans antiseptiques.....	9.96	milligrammes d'Az	.	.
saturé de thymol	6.72	—	—	3.24
— - chloroforme	5.82	—	—	4.14
avec 1 p. c. de formol.....	3.20	—	—	6.76
— 1 — d'acide benzoïque..	2.16	—	—	7.80
— 1 — — salicylique..	0.92	—	—	9.04

L'influence retardatrice de ces deux derniers corps, qui ne sont pas des antiseptiques très énergiques, tient, sans doute, à ce qu'ils ont provoqué une précipitation au liquide laquelle probablement a entraîné la plupart des enzymes; peut-être aussi ont-ils transformé la protéine en un corps non fermentescible. En effet, des essais de brassage, dans lesquels je n'entrerai pas ici²⁾, ont fait preuve d'une protéolyse fortement activée par l'addition d'acide salicylique à 0.2 p. c. dans des circonstances où celui-ci a clairement agi en sa qualité d'acide, y étant en quantité trop petite pour jouer le rôle d'un précipitant. Mais on voit que le thymol, aussi bien que le chloroforme et que, surtout, le formol, ont eu un effet très retardateur sur la protéolyse.

J'ai encore fait des recherches spéciales sur la manière dont se comporte la protéolyse par rapport au formol et au toluol.

Formol. J'emploie la solution de formol ou de formaline du commerce contenant environ 40 p. c. d'aldéhyde formique.

¹⁾ Fr. Weis: Zeitschr. f. physiol. Chemie XXXI, 84 (1900).

²⁾ Voir Fr. Weis: ibid. p. 92—93.

I^{re} Série (Essais nos. 549—566). L'objet de ces essais est de rechercher l'influence de doses différentes. Pour que le formol ne s'échappe pas, les fioles sont pourvues de bouchons. Voici quel est le dédoublement d'azote (c'est à dire la quantité d'azote échappant à la précipitation par l'acide tannique) qui a eu lieu au bout de deux heures, à 47°:

	milligrammes d'Az			
Sans formol.....				10.16
par l'addit. de 1 goutte ¹) de formol = env. 0.05 p. c. d'aldéhyde formique				6.28
— - 2 — — = -	0.10	—	—	6.34
— - 4 — — = -	0.20	—	—	4.96
— - 6 — — = -	0.30	—	—	4.16
— - 8 — — = -	0.40	—	—	3.82
— - 10 — — = -	0.50	—	—	3.12
— - 12 — — = -	0.60	—	—	2.54

Ce qui est surprenant c'est l'effet énorme de l'addition de 0.05 p. c. d'aldéhyde formique (v. la courbe la plus basse de la planche XII). —

II^e Série (Essais nos. 535—548). L'objet de ces essais est la recherche de la vitesse avec laquelle agit une certaine quantité, en ce cas-ci 1 p. c., de formol (= 0.4 p. c. d'aldéhyde formique). En effet, il est possible que toute action fermentative s'arrête au bout d'un certain temps par suite de la décomposition de toute enzyme; il est possible aussi qu'une partie de l'enzyme reste intacte pendant toute la durée de l'expérience. Seul précipitant: l'acide tannique. Température de 47°:

	Sans formol milligrammes	Avec du formol milligrammes
Au bout de 1/2 heure il y a 3.82 d'Az dédoublé	1.12 d'Az dédoublé	
— - 1 — — , —	2.14 —	
— - 2 heures — 10.16 —	2.46 —	

Ces résultats semblent indiquer que la quantité totale d'enzyme a été détruite successivement et que l'extrait de malt, grâce à 1 p. c. de formol, aura perdu tout pouvoir fermentatif au bout d'une heure (v. cependant Essais p. 224). — Il serait intéressant d'examiner si l'extrait pourra reprendre son pouvoir fermentatif, si on en chasse tout le formol par la chaleur. J'aurais été disposé à répondre par la négative si, au sujet d'autres enzymes, la littérature ne donnait des indications dans le sens contraire.

¹) 1^{cc} contient 40 de ces gouttes. Comme à l'ordinaire, le liquide à essayer consiste en 10^{cc} d'extrait de malt + 10^{cc} de solution de protéine.

Suivant Benedicenti¹⁾, différentes substances albuminoïdes (fibrine, sérum du sang, caséine, ovalbumine, gélatine), soumises à l'action prolongée d'aldéhyde formique, subissent, entre autres changements, celui de devenir indigestibles tant à la pepsine qu'à la trypsine, l'aldéhyde formique se réunissant à ces corps pour former des composés nouveaux. En chauffant dans un courant de vapeur, on pourra l'en séparer de nouveau, les substances protéiques reprenant ainsi leurs propriétés primitives. Des auteurs postérieurs ont trouvé, cependant, que, quant à la pepsine, l'aldéhyde ne fait qu'en retarder l'action, sans l'arrêter complètement. Et récemment Leo Schwarz („Ueber Verbindungen der Eiweisskörper mit Aldehyden“)²⁾ est venu confirmer cette manière de voir. Il fait agir l'aldéhyde formique en petite quantité („quelques gouttes d'une solution de formol“) et en des temps divers (de „sehr kurz bis 2 Monate“) sur des albuminoïdes du sérum. Il se forme de la sérumalbumine de méthylène contenant relativement plus de carbone et moins d'azote que la sérumalbumine primitive et ne coagulant plus à l'ébullition. Il soumet ce corps à une digestion partie avec de la pepsine + de l'acide chlorhydrique, partie avec de la trypsine + du carbonate de sodium; à titre de contrôle il laisse agir les mêmes enzymes sur des filaments fibreux. Comme criterium de la digestion, il se sert de la réaction du biuret. Mais qu'il se servît de préparations contenant de l'aldéhyde libre ou non les essais avec la trypsine ne donnaient jamais la réaction du biuret, pas même au bout de 24 heures, tandis que les essais avec la pepsine montraient toujours cette réaction au bout de très peu de temps. Schwarz en conclut que l'aldéhyde formique transforme l'albumine de manière à la rendre inattaquable par la trypsine (mais non pas par la pepsine). A ce propos il cite Bliss et Novy qui, ayant fait des recherches systématiques sur l'influence de l'aldéhyde formique sur les enzymes, déclarent que la trypsine se détruit facilement tandis que la pepsine résiste, pendant des semaines, à jusqu'à 5 p. c. d'aldéhyde formique — encore un exemple de la réaction spécifique des antiseptiques divers sur les enzymes.

Ces données m'ont conduit à faire des recherches analogues sur l'action de l'aldéhyde formique sur la protéine de froment et les extraits de malt. Voici ces essais:

III^e Série (Essais nos. 1955 a—1962 a, 1981—1994). Le 2 avril 1901, j'ai placé dans un lieu tranquille deux fioles contenant chacune 100^{cc} d'une solution de protéine (2 p. c.) dans une solution d'acide

¹⁾ A. Benedicenti: Arch. für Anat. u. Physiol. Phys. Abt., p. 219 (1897).

²⁾ Leo Schwarz: Zeitschr. für physiol. Chemie XXXI, 460 (1901).

lactique. L'une d'elles à laquelle on avait ajouté 2 p. c. de formol, est fermée d'un bouchon de liège. L'autre, exempte de formol, est stérilisée en la chauffant au bain-marie en ébullition, et pourvue d'un bouchon de coton. Toutes les deux, soumises à la température ambiante, restent parfaitement limpides. — Le 3 mai, à 3 heures du soir, deux parties du même extrait frais de malt ont été placées dans l'armoire glacière; à l'une on a ajouté 2 p. c. de formol, à l'autre rien. Le lendemain l'échantillon au formol présentait une teinte opalisante, étant d'une nuance un peu plus claire (évidemment le formol avait détruit les oxydases) que l'autre, resté parfaitement translucide et gardant son odeur fraîche. Le 4 mai, on a fait les essais en mêlant les différents échantillons (v. plus loin). Pour être court, on désignera dans la suite l'extrait de malt contenant du formol par edm. +, celui qui n'en contient pas par edm. ÷ et, d'une manière analogue, les solutions de protéine par prot. + et prot. ÷. Pendant les essais actifs, qui duraient 1 heure 45 minutes, à 50°, des différences caractéristiques se sont manifestées entre les essais avec et sans formol. Dans le premier cas, il y avait formation d'un coagulum abondant ou d'un précipité en croûte; dans l'autre cas, il n'y avait ni coagulum, ni précipité. Nous indiquerons, dans une colonne à part, ces différents phénomènes par les signes: + C, + P, ÷ C, ÷ P. On s'est servi, comme précipitants, tant du chlorure stanneux que de l'acide tannique. L'extrait de malt contenait, en 10^{cc}, 21^{mg}.04 d'azote total dont 13^{mg}.64 avaient échappé à la précipitation par le chlorure stanneux, 11^{mg}.08 à celle par l'acide tannique. Cet extrait était d'une action très énergique.

	Phénomène de coagulation	Az du liq. filtré du chlorure stanneux	Az dédoublé	Az du liq. filtré de l'acide tannique	Az dédoublé
		mg.	mg.	mg.	mg.
edm. ÷ prot. ÷	÷ C ÷ P	41.24	24.80	22.68	11.64
edm. ÷ prot. +	+ P	24.74	8.30	13.68	2.64
edm. + prot. ÷	+ C	25.76	9.32	12.92	1.88
edm. + prot. +	+ + C	19.84	3.40	11.48	0.44

On chauffe alors pendant 20 minutes au bain-marie en ébullition la moitié de la solution de protéine contenant du formol pour en chasser, si possible, du formol; puis on l'expose, pendant 1 heure 45 minutes, à la température de 52°, à l'action d'une partie de l'extrait de malt exempte de formol (edm. ÷ prot. + chauffé). A titre de comparaison, on fait agir l'extrait de malt, simultanément, sur une

rure stanneux et l'acide tannique servant de précipitants. Les résultats sont réunis dans le tableau suivant:

	Précipitation par le chlorure stanneux		Précipitation par l'acide tannique	
	Az du liq. filtré	Az dé-doublé	Az du liq. filtré	Az dé-doublé
7 mai 1901, extrait de malt frais, expérience passive ...	mg. 16.32	mg. "	mg. 9.92	mg. "
— — — — — avec 0 gouttes de toluol	40.26	23.94	22.12	12.3
— — — — — $\left. \begin{array}{l} \text{expériences actives} \\ \text{— 2 — — —} \\ \text{— 4 — — —} \\ \text{— 6 — — —} \\ \text{— 8 — — —} \\ \text{— 10 — — —} \end{array} \right\}$	"	"	21.16	11.34
— — — — —	"	"	20.96	11.04
— — — — —	38.24	21.92	20.60	10.68
— — — — —	"	"	20.04	10.12
— — — — —	"	"	20.60	10.68
15 — après 8 jours avec du toluol à 5°, expér. active ¹⁾	38.98	22.66	19.49	9.57
7 nov. — 6 mois avec du toluol, expér. passive....	16.28	"	13.12	"
— — 6 — — — — — active	31.28	15.00	16.88	3.76

Il en résulte que de petites quantités de toluol exercent une action sensible, quoique minime, sur l'enzyme pepsique aussi bien que sur l'enzyme trypsique, et que cette influence ne s'accroît guère quand même la quantité de toluol augmente. Il s'ensuit encore du tableau que le pouvoir pepsique de l'extrait de malt n'est pas affaibli du tout au bout de 8 jours; et qu'au bout de 6 mois il conserve environ les $\frac{2}{3}$ de sa force primitive: pendant ce long espace de temps il est, pour ainsi dire, resté en suspens, la teneur de l'extrait de malt en composés azotés, échappés à la précipitation par le chlorure stanneux, étant restée au même point. Quant au pouvoir trypsique, un affaiblissement commence à se faire sentir, autant qu'on peut en juger, déjà au bout de 8 jours, mais tellement peu considérable que le pouvoir trypsique est encore apparent ($\frac{1}{3}$ de la force primitive à peu près) au bout de 6 mois de repos de l'extrait de malt. Ce pouvoir n'a pas été entièrement suspendu: la teneur de l'extrait de malt en composés azotés qui échappent à la précipitation par l'acide tannique a sensiblement augmenté.

¹⁾ Le temps d'essai a été, pour cette expérience, 2 heures et demie au lieu de deux heures. Aussi les chiffres trouvés ont-ils été réduits en multipliant par $\frac{4}{5}$ en supposant l'action proportionnelle à la durée. Il en résulte une erreur qui rend moins exacts les chiffres de cette série.

IV.

Nature et mode d'action des enzymes.

A tous les essais décrits plus haut on a opéré avec un extrait aqueux de malt vert au stade où, dans la fabrication du malt de la brasserie de Gamle Carlsberg, on interrompt la germination (c. à d. au neuvième jour de germination). Le pouvoir fermentatif protéolytique de cet extrait a été mesuré par l'action qu'il exerce sur une solution de protéine de froment ou, par exception, sur une solution de légumine. On a examiné la dépendance de la protéolyse — surtout aux phases révélées par les précipitations par le chlorure stanneux et par l'acide tannique — de facteurs divers: température, temps, quantité de ferment, concentration de la protéine, présence de matières étrangères, corrélations, enfin, entre tous ces facteurs. Comme la protéine de froment employée est congénère des matières protéiques déposées au grain d'orge comme réserve nutritive, il est permis de supposer que, pendant la germination, la protéolyse à l'intérieur du grain d'orge suit des lois semblables à celles que j'ai trouvées.

Les résultats obtenus ne laissent aucun doute que la protéolyse ne soit une action diastasique qui, par conséquent, peut se passer aussi en dehors de la cellule vivante. Un assez grand nombre de questions se présentent maintenant, auxquelles je vais tâcher de donner des réponses épuisant plus ou moins le sujet.

1° L'action est-elle causée par une seule enzyme ou par plusieurs se laissant séparer ou préparer à l'état pur?

2° Quelles sont les propriétés physiques et chimiques?

3° Quelles sont les matières protéiques qu'elles pourraient dédoubler?

4° Quels sont les corps qui se forment pendant leur action?

5° A quel moment de la germination paraissent-elles;

6° ou se trouvent-elles déjà, à l'état actif ou sous la forme de proenzymes, au grain d'orge non germé?

Naturellement, on pourrait augmenter le nombre des questions, mais, quand je me borne à celles-là, c'est que je pense ne pouvoir donner, en ce moment, des contributions qu'à la solution de ces points-là.

En général, je n'ai pas suivi de plan systématique. Il faut considérer une partie de mes expériences là-dessus comme des digressions occasionnelles de mon but principal: trouver les lois générales de la protéolyse. Parmi ces questions, cependant, il y en a d'un attrait tellement grand que j'en ai fait l'objet de recherches spéciales.

ture stanneux et l'acide tannique servant de précipitants. Les résultats sont réunis dans le tableau suivant:

				Précipitation par le chlorure stanneux		Précipitation par l'acide tannique	
				Az du liq. filtré	Az dé-doublé	Az du liq. filtré	Az dé-doublé
				mg.	mg.	mg.	mg.
7 mai 1901, extrait de malt frais, expérience passive ...				16.32	"	9.92	"
— — — — —	expériences actives	avec 0 gouttes de toluol		40.26	23.94	22.12	12.20
— — — — —		— 2 — — —		"	"	21.16	11.24
— — — — —		— 4 — — —		"	"	20.96	11.04
— — — — —		— 6 — — —		38.24	21.92	20.60	10.68
— — — — —		— 8 — — —		"	"	20.04	10.12
— — — — —		— 10 — — —		"	"	20.60	10.68
15 — après 8 jours avec du toluol à 5°, expér. active ¹⁾				38.98	22.66	19.49	9.57
7 nov. — 6 mois avec du toluol, expér. passive....				16.28	"	13.12	"
— — 6 — — — — — active				31.28	15.00	16.88	3.76

Il en résulte que de petites quantités de toluol exercent une action sensible, quoique minime, sur l'enzyme pepsique aussi bien que sur l'enzyme trypsique, et que cette influence ne s'accroît guère quand même la quantité de toluol augmente. Il s'ensuit encore du tableau que le pouvoir pepsique de l'extrait de malt n'est pas affaibli du tout au bout de 8 jours; et qu'au bout de 6 mois il conserve environ les $\frac{2}{3}$ de sa force primitive: pendant ce long espace de temps il est, pour ainsi dire, resté en suspens, la teneur de l'extrait de malt en composés azotés, échappés à la précipitation par le chlorure stanneux, étant restée au même point. Quant au pouvoir trypsique, un affaiblissement commence à se faire sentir, autant qu'on peut en juger, déjà au bout de 8 jours, mais tellement peu considérable que le pouvoir trypsique est encore apparent ($\frac{1}{3}$ de la force primitive à peu près) au bout de 6 mois de repos de l'extrait de malt. Ce pouvoir n'a pas été entièrement suspendu: la teneur de l'extrait de malt en composés azotés qui échappent à la précipitation par l'acide tannique a sensiblement augmenté.

¹⁾ Le temps d'essai a été, pour cette expérience, 2 heures et demie au lieu de deux heures. Aussi les chiffres trouvés ont-ils été réduits en multipliant par $\frac{4}{5}$ en supposant l'action proportionnelle à la durée. Il en résulte une erreur qui rend moins exacts les chiffres de cette série.

IV.

Nature et mode d'action des enzymes.

A tous les essais décrits plus haut on a opéré avec un extrait aqueux de malt vert au stade où, dans la fabrication du malt de la brasserie de Gamle Carlsberg, on interrompt la germination (c. à d. au neuvième jour de germination). Le pouvoir fermentatif protéolytique de cet extrait a été mesuré par l'action qu'il exerce sur une solution de protéine de froment ou, par exception, sur une solution de légumine. On a examiné la dépendance de la protéolyse — surtout aux phases révélées par les précipitations par le chlorure stanneux et par l'acide tannique — de facteurs divers: température, temps, quantité de ferment, concentration de la protéine, présence de matières étrangères, corrélations, enfin, entre tous ces facteurs. Comme la protéine de froment employée est congénère des matières protéiques déposées au grain d'orge comme réserve nutritive, il est permis de supposer que, pendant la germination, la protéolyse à l'intérieur du grain d'orge suit des lois semblables à celles que j'ai trouvées.

Les résultats obtenus ne laissent aucun doute que la protéolyse ne soit une action diastasique qui, par conséquent, peut se passer aussi en dehors de la cellule vivante. Un assez grand nombre de questions se présentent maintenant, auxquelles je vais tâcher de donner des réponses épuisant plus ou moins le sujet.

1° L'action est-elle causée par une seule enzyme ou par plusieurs se laissant séparer ou préparer à l'état pur?

2° Quelles sont les propriétés physiques et chimiques?

3° Quelles sont les matières protéiques qu'elles pourraient dédoubler?

4° Quels sont les corps qui se forment pendant leur action?

5° A quel moment de la germination paraissent-elles;

6° ou se trouvent-elles déjà, à l'état actif ou sous la forme de proenzymes, au grain d'orge non germé?

Naturellement, on pourrait augmenter le nombre des questions, mais, quand je me borne à celles-là, c'est que je pense ne pouvoir donner, en ce moment, des contributions qu'à la solution de ces points-là.

En général, je n'ai pas suivi de plan systématique. Il faut considérer une partie de mes expériences là-dessus comme des digressions occasionnelles de mon but principal: trouver les lois générales de la protéolyse. Parmi ces questions, cependant, il y en a d'un attrait tellement grand que j'en ai fait l'objet de recherches spéciales.

L'ordre chronologique des expériences diffère de l'ordre que je suis en communiquant ici mes résultats. En effet, je crois pratique de faire ressortir d'abord ce qui sert à élucider les questions suivantes et, pour l'orientation du lecteur, je citerai quelquefois mes conclusions avant de donner les résultats expérimentaux sur lesquels je fonde ces conclusions.

Je commence tout de suite par l'exposition d'une des questions le plus pressantes et à laquelle j'ai touché plus d'une fois dans ce qui précède :

1. Y a-t-il dans l'orge en germination plusieurs enzymes protéolytiques se laissant séparer ou préparer à l'état pur?

J'ai déjà répondu à cette question en déclarant qu'à mon avis, il y en a deux, au moins: une enzyme pepsique et une enzyme trypsique, sans parler d'une enzyme coagulant les matières albuminoïdes et qui, comme la présure, agit sur la caséine du lait. Sur celle-ci, j'ai publié ailleurs quelques essais¹⁾. De même, j'ai dit plus haut qu'en parlant d'une enzyme pepsique et d'une enzyme trypsique j'entends par là des enzymes dont la première ne mène le dédoublement de matières protéiques qu'aux albumoses et aux peptones ou à des substances précipitables par l'acide tannique, mais imprécipitables par le chlorure stanneux, tandis que la dernière continue le dédoublement de ces produits de dédoublement, de manière à former des composés qui se soustraient non seulement à la précipitation par l'acide tannique, mais encore, en partie, à la précipitation par l'acide phosphotungstique et par l'acétate uranique, et parmi lesquels on trouve, entre autres substances, des quantités considérables d'ammoniaque, ainsi que, dans quelques cas (à la digestion de fibrine) des groupes donnant, dans une solution acéteuse, avec de l'eau de brome, la réaction de tryptophane. Je reviendrai plus tard sur la caractérisation particulière de ces enzymes. J'exposerai tout de suite les raisons de mon assertion. Puis j'examinerai si les deux enzymes sont à même d'agir indépendamment l'une de l'autre, ou s'il y a, entre elles, une dépendance mutuelle.

Il résulte de ce qui a été dit dans la partie précédente (III) que la protéolyse présente deux phases, au moins, ou qu'elle consiste en deux activités qui font voir des rapports de dépendance un peu différents vis à vis des facteurs extérieurs. Ainsi on trouve une différence frappante en examinant l'influence de la température sur les deux activités qui se révèlent par les précipitations par le chlorure stanneux et par l'acide tannique (v. p. 167 ss.). Ce n'est pas seulement que les

¹⁾ Fr. Weis: Zeitschr. für physiol. Chemie XXXI, 96 (1900).

deux courbes de température varient beaucoup de forme, mais les minima et les optima se trouvent à des températures diverses, ainsi que j'ai fait observer p. 174 (v. aussi Pl. I).

Si l'on suit la protéolyse pendant un temps très long, on voit une différence frappante entre le cours des deux actions. A des concentrations faibles de protéine (1 p. c.), l'une (la pepsique) a atteint son maximum au bout d'environ 3—6 heures, tandis que l'autre (la trypsique) se passe plus lentement pour commencer, mais, d'autre part, se continue d'une manière uniforme jusque vers les 48 heures, période où les courbes, indiquant les deux actions, se coupent presque. Quand même on emploie des concentrations plus fortes de protéine ($2\frac{1}{2}$ et 5 p. c.), la courbe pepsique se caractérise toujours par son accroissement très rapide, pendant la première heure presque perpendiculaire, mais qui s'incline relativement vite et d'une manière très prononcée vers l'axe des abscisses, tandis que la courbe trypsique monte moins rapidement pour commencer, mais continue pendant un temps assez long dans la même direction. — Il y a, naturellement, un rapport de dépendance mutuelle entre les deux actions, l'une des courbes étant, en partie, déterminée par l'autre, rapport sur lequel je vais revenir.

Il résulte encore de mes essais sur l'influence qu'exercent sur la protéolyse les matières étrangères, que les deux phases de celle-ci en sont influées à un degré assez différent, c'est à dire qu'elles ne se déroulent pas également bien dans le même milieu. C'est ce qu'on pourra, sans doute, observer particulièrement bien en ajoutant des quantités différentes d'acides, qui jouent un si grand rôle comme agents zymoplastiques. Malheureusement je n'ai, jusqu'à présent, examiné l'influence des acides que sur l'une des deux actions, la trypsique. Mais les indications que donnent mes essais sur l'influence des alcalis portent à croire, ce que prouvent à l'évidence les essais sur l'influence d'antiseptiques, que la même substance agit, à un degré très différent, sur les deux actions.

L'hydrate de sodium aussi bien que le carbonate de sodium neutre ont beaucoup moins de pouvoir zymoplastique, supposé qu'en général ils en aient (j'ai déjà dit, à la p. 204, qu'on n'a pas examiné ce qui se passe en milieu neutre), que les acides examinés; et l'addition d'un tout petit peu d'alcali empêche complètement la protéolyse. Ceci est le cas, particulièrement, pour l'action trypsique, paralysée aux moindres doses d'alcali à un tel point qu'elle cesse complètement à une concentration égale à une liqueur titrée normale alcaline au 40°.

A la p. 219 et suivantes j'ai décrit, en détail, l'action qu'exercent des antiseptiques, surtout le formol et le toluol, sur la propriété pro-

téolytique de l'extrait de malt. Je me bornerai ici à relever quelques traits particulièrement frappants.

En regardant le rapport entre le dédoublement pepsique et le trypsique au bout d'un temps peu étendu — 2 heures — si on n'a ajouté ni antiseptique ni autre substance nuisible, on verra qu'il est, à l'ordinaire, comme $\frac{2}{1}$, c'est à dire qu'au courant de ce temps il s'est soustrait deux fois autant, à peu près, d'azote à la précipitation par le chlorure stanneux qu'à la précipitation par l'acide tannique. Mais si l'on a ajouté des antiseptiques, ou surtout si, avant de faire l'essai, on a soumis, pendant quelque temps, l'extrait de malt à l'action d'un antiseptique, ce rapport se rompt presque toujours, le dédoublement trypsique s'affaiblissant beaucoup plus que le dédoublement pepsique ou finissant par s'arrêter presque entièrement (v. Essais p. 223 et 226). Ainsi, tandis que, dans un extrait de malt laissé, pendant six mois, avec du toluol, le pouvoir pepsique n'avait abaissé qu'à $\frac{2}{3}$, à peu près, de sa force primitive, le pouvoir trypsique était descendu à $\frac{1}{3}$. Dans un autre échantillon du même extrait de malt, laissé, pendant le même temps, avec du formol, l'affaiblissement avait atteint environ $\frac{1}{5}$ et $\frac{1}{15}$ du pouvoir fermentatif primitif, ou le rapport entre le pouvoir pepsique et le pouvoir trypsique était, dans la préparation de toluol, d'environ 4 à 1, dans la préparation de formol, de 7 à 1.

Ces faits me semblent parler en faveur de l'existence de deux causes, au moins, des différentes phases de la protéolyse, et si l'on part de l'avis que l'action est diastasique — ce qui revient à dire qu'on n'en connaît pas la vraie cause — et si l'on considère que les enzymes sont des unités soit chimiques soit physiques, c'est à dire qu'elles sont, ou des individus chimiques d'une constitution particulière ou des vibrations moléculaires d'une qualité déterminée, il me semble logiquement nécessaire de rapporter les actions diverses à des enzymes diverses: à deux, au moins. Tant que, pour les enzymes, on n'a d'autre criterium que leurs effets, il faudra supposer l'existence d'une enzyme spéciale pour chaque action spécifique qui se passe d'après des lois bien déterminées. On pourrait se figurer, il est vrai, qu'une seule et même enzyme pourrait exercer des effets différents dédoublant des molécules différentes (on connaît très bien de ces enzymes, par exemple, l'émulsine et la myrosine). Mais si le dédoublement d'une molécule suit des lois tout autres que fait le dédoublement d'autres molécules, ou si un extrait de malt, par suite d'influences extérieures diverses, perd complètement ou presque complètement le pouvoir de provoquer certains dédoublements, tout en conservant presque intact le reste de ses fonctions, c'est un phénomène dont on trouve l'explication la plus naturelle en supposant que ce facteur

extérieur détruit ou affaiblit quelque enzyme, sans agir de même sur d'autres enzymes.

Ce qui parle en faveur de cette manière de voir plus encore que tout ce que je viens de dire, ce sont les résultats d'une petite série spéciale d'essais. A plusieurs reprises, j'avais essayé de faire une préparation d'enzyme sèche en ajoutant à un extrait de malt aqueux 3—4 fois son volume d'alcool absolu. Le précipité, séparé par filtration, était lavé à sec à l'alcool, puis séché dans le vide sur de l'acide sulfurique. Après l'avoir redissous dans de l'eau, on en a essayé le pouvoir protéolytique, comme à l'ordinaire, en le faisant agir sur une solution de protéine faiblement acidulée par de l'acide lactique. Aux premiers essais je n'y employais, comme précipitant, que l'acide tannique. Les traits de pouvoir fermentatif (trypsique) obtenus ainsi étaient nuls ou tellement petits que j'étais plutôt disposé à les considérer comme causés par des erreurs expérimentales et à accepter l'impossibilité de produire ainsi une préparation d'enzyme active.

Plus tard, j'ai procédé d'une manière un peu différente. J'ai fait digérer 440^{gr} de malt vert écrasé avec 440^{cc} de glycérine + 150^{cc} d'eau. Après des agitations répétées, le mélange a été laissé dans l'armoire glacière pendant deux fois vingt-quatre heures. Puis, on l'a pressuré. Le liquide obtenu ainsi est jeté sur un filtre et laissé dans l'armoire glacière pendant vingt-quatre heures. On a obtenu ainsi 400^{cc} de liquide filtré clair. On en a versé 300^{cc} en filet mince dans 2 litres d'alcool absolu. Le précipité formé est séparé par filtration sur un appareil de Büchner. On le lave à l'alcool absolu (pour enlever l'eau et la glycérine); on le sèche sur le filtre, à l'air. Le lendemain, on le pulvérise: on le lave de nouveau à l'alcool absolu. On le laisse sécher à l'air jusqu'au lendemain. Enfin, on le sèche dans le vide, sur de l'acide sulfurique, pendant 10 jours. Le produit total obtenu, pesant 4^{gr}, consistait en une poudre blanche d'une teinte jaunâtre. On fait digérer 0^{gr}.5 de cette poudre avec 100^{cc} d'eau et 0^{gr}.1 d'acide lactique; on chauffe à 50°, et on laisse le mélange dans l'armoire glacière jusqu'au lendemain. On sépare par filtration la partie en solution (Enz.-Aq.). On traite le résidu avec de la glycérine, qui le dissout presque complètement. On filtre cette solution (Enz.-Glyc.) avant de s'en servir. On mesure le pouvoir fermentatif protéolytique des deux solutions en faisant agir, pendant 2 heures, à 50°, sur des volumes égaux d'une solution de protéine à 2 p. c. dans de l'acide lactique à 0.4 p. c., ce qui donne aux liquides à essayer une teneur en acide lactique de 2.5 p. m. et 2 p. m. respectivement. Comme précipitants, on se sert d'acide tannique et de chlorure stanneux. Les résultats se voient des tableaux suivants:

	Précipitation par	Az du liquide filtré		Az dé- doublé
		pour com- mencer	au bout de 2 heures à 50°	
		mg	mg	mg
Enz.-Aq.	le chlorure stann.	2.44	5.64	3.20
— —	l'acide tannique	1.28	1.28	0.00
Enz.-Glyc.	le chlorure stann.	2.10	2.10	0.00
— —	l'acide tannique	0.70	0.40	+ 0.30

Comme auparavant, l'action de la phase révélée par le tannin est nulle (le chiffre négatif d'„Az dédoublé“ du dernier essai doit être attribué à des erreurs expérimentales), tandis que l'action pepsique est assez considérable, vu la concentration de la solution diastasique (je reviendrai tout à l'heure sur ce dernier point).

Après, j'ai fait encore une série d'essais avec la même préparation en employant, pourtant, une concentration double de l'enzyme (1 p. c.), obtenue en traitant la préparation sèche d'enzyme, pendant une demi-heure, à 45°, avec de l'eau faiblement acidulée par de l'acide lactique. La solution a été mise en usage tout de suite après la filtration. De peur que la préparation ne fût trop pauvre en cendres, on y a ajouté $\frac{1}{2}$ p. c. de chlorure de sodium. Pour le contrôle, on a chauffé une partie de la solution à 100° pour détruire l'enzyme. Puis on mélange, comme auparavant, la partie non-bouillie et la partie bouillie avec la solution de protéine, laissant reposer les mélanges, à 50°, pendant 2 heures. En voici les résultats :

	Précipitation par	Az du liquide filtré		Az dé- doublé
		pour com- mencer	au bout de 2 heures à 50°	
		mg	mg	mg
Solut. d'enzyme non bouillie	le chlorure stann.	4.32	12.10	7.78
— — — —	l'acide tannique	1.78	2.92	1.14
Solution d'enzyme bouillie	le chlorure stann.	4.08	4.24	0.16
— — —	l'acide tannique	1.72	1.84	0.12

Tandis que les traits de la solution d'enzyme bouillie sont du ressort des erreurs expérimentales, la solution non bouillie fait preuve d'une action trypsique prononcée. Mais, proportionnellement à la concentration des enzymes, l'action pepsique a doublé, comparée à celle

du premier essai. Elle n'est pas beaucoup plus faible que l'action correspondante d'un extrait de malt frais¹⁾.

Ainsi quand même l'activité trypsique n'a pas été entièrement supprimée, le rapport entre les pouvoirs fermentatifs pepsique et trypsique est de $\frac{7.78}{1.14} =$ environ $\frac{7}{1}$ comparé au rapport ordinaire de $\frac{2}{1}$, en d'autres mots: l'affaiblissement du pouvoir fermentatif trypsique est encore plus grand qu'à l'addition d'antiseptiques à un extrait de malt.

Il est donc naturel de conclure que des deux enzymes protéolytiques dont je crois avoir démontré l'existence dans un extrait de malt, une seule s'obtient sans affaiblissement notable à la précipitation ordinaire par l'alcool absolu. Probablement l'alcool en détruit l'autre, ce qui s'accorde avec le fait (v. pp. 218—19) que la phase trypsique de la protéolyse est considérablement retardée par l'addition d'alcool, et cela proportionnellement à la force croissante des concentrations de cette substance. Il serait très intéressant de rechercher quelle est l'action qu'exerce l'alcool sur la phase pepsique de la protéolyse. Peut-être l'addition d'alcool empêcherait-elle le dédoublement au-delà de la formation d'albumoses et de peptones. — Peut-être aussi sommes-nous en bonne voie pour arriver à la séparation complète des deux enzymes et à la préparation à l'état pur de l'une d'elles.

La preuve absolument sûre de l'existence de deux enzymes demanderait la séparation complète de leurs actions. A cet égard, mes essais ne sont pas tout-à-fait satisfaisants. C'est aussi une question si l'une des enzymes pourra agir tout indépendamment de l'autre, ou s'il existe entre elles un rapport de dépendance soit unilatérale soit mutuelle. Mes essais semblent indiquer que l'enzyme pepsique peut agir sans le concours de la trypsique, mais jusqu'à quel point celle-ci exerce sur l'autre une influence favorable ou une influence retardatrice, c'est ce qui ne résulte pas clairement de mes essais. Cependant, je suis disposé à croire qu'il faut que l'enzyme trypsique — toute abstraction

¹⁾ Ceci résultera de la considération que voici: en comptant que 10^{cc} de l'extrait de malt primitif dédoublent, en 2 heures, à 50°, 10^{mg} d'azote de manière à les rendre imprécipitables par le chlorure stanneux, 300^{cc} dédoubleront 300^{mg} d'azote. Si la préparation d'enzyme n'était pas affaiblie, 4^{gr} de celle-ci en feraient de même, supposé que toute l'enzyme fût précipitée. Par conséquent, 10^{cc} d'une solution à 0.5 p. c. dédoubleraient 3^{mg}.75 d'azote et 10^{cc} d'une solution à 1 p. c. 7^{mg}.50 d'azote en 2 heures. Or, l'azote dédoublé, trouvé aux concentrations correspondantes, est de 3^{mg}.20 et de 7^{mg}.78. Ainsi, quand même l'action protéolytique d'un extrait de malt frais est calculée assez bas ici, le pouvoir fermentatif pepsique de la préparation sèche s'approche du pouvoir fermentatif ordinaire, surtout en considérant qu'une partie de la préparation s'est perdue pendant la manipulation (v. p. 237 le pouvoir fermentatif d'extraits de glycérine comparés aux extraits aqueux).

faite de sa propriété possible de peptoniser, c'est à dire de former les premiers produits de dédoublement hydrolytiques (albumoses, peptones) — soutienne la pepsique en en éloignant les produits de fermentation, qui, sans cela, arrêteraient probablement la peptonisation, arrivée à un point d'équilibre. D'autre part, l'enzyme pepsique accélérerait, sans doute, le dédoublement trypsique en se chargeant des premières phases de la protéolyse et en produisant ainsi des matériaux de fermentation moins compliqués. La marche plus lente de l'activité trypsique s'explique par le fait que c'est l'enzyme pepsique qui doit continuellement lui fournir de nouveaux matériaux de fermentation, et encore par cette autre circonstance que rien n'éloigne les produits de fermentation de l'activité trypsique, à moins d'admettre l'existence d'une série d'autres enzymes qui continuent, de phase en phase, le dédoublement de la molécule d'albumine jusqu'à ce qu'il atteigne les composés minéraux les plus simples, supposition qu'aucune considération aprioristique n'empêche d'accepter.

Ce serait une discussion sans issue que celle qui, en se fondant sur les essais décrits plus haut, entamerait la question de décider si l'enzyme trypsique est à même de peptoniser ou non. A l'ordinaire, on voit dans la trypsine animale une seule enzyme, manière de voir qui, à mon avis, est très douteuse, et on lui attribue la propriété de former aussi des albumoses et des peptones. S'il en était ainsi, il n'y aurait pas lieu de refuser à la trypsine végétale la même propriété. Mais on verra facilement que la décision de cette question est extrêmement difficile, vu qu'on pourra expliquer tout trait positif de peptonisation en maintenant qu'on n'aura pas complètement écarté l'enzyme pepsique, et, d'après tout ce que nous savons, les enzymes trypsiques semblent bien plus sensibles aux influences extérieures nuisibles que les enzymes pepsiques¹⁾.

Mais, dans tous les cas, il faudra prendre en considération ce concours des deux enzymes si on désire trouver les fonctions de chacune d'elles. Les courbes, trouvées plus haut, pour la phase pepsique de la protéolyse, auraient peut-être pris des formes tout autres si l'activité trypsique ne s'était pas simultanément opérée. Aussi j'écarte toute interprétation d'après laquelle je croirais avoir trouvé, pour les deux enzymes, des lois qu'elles suivraient aussi si elles agissaient séparément. Tout en tâchant de faire des analyses, je me rends

¹⁾ Du reste, on connaît aujourd'hui une enzyme qui n'est pas capable de dédoubler les matières albuminoïdes proprement dites, mais bien les albumoses et les peptones pour en faire des composés cristallins: l'érepsine, décrite par Cohnheim (v. Zeitsch. f. physiol. Chemie XXXIII, 459 (1901) et XXXV, 134 (1902).

très exactement compte du peu que j'ai obtenu pour opérer la séparation des deux activités. S'il y a un point sur lequel je désire insister c'est celui-ci: à mon avis, la protéolyse à l'intérieur de l'orge en germination est beaucoup trop compliquée pour qu'on puisse dégager toutes les phases de sa marche d'après les données que j'ai fournies. Ce que j'ai fait c'est, plutôt, d'avoir soulevé une série de problèmes nouveaux.

Je pense, pourtant, qu'on trouvera dans ce que j'ai exposé assez de raisons pour accepter la supposition que, dans l'orge en germination, il y a, au moins, deux enzymes protéolytiques: la peptase et la tryptase.

2. Propriétés chimiques et physiques.

Ce que j'ai à communiquer à ce sujet se rapporte notamment à l'enzyme trypsique, la plupart des essais étant faits en ne se servant, comme précipitant, que de l'acide tannique. Mais comme, le plus souvent, j'ai opéré avec des extraits de malt contenant toujours en même temps l'enzyme pepsique, les résultats de mes essais ne peuvent pas prétendre à une validité absolue pour l'une des enzymes, qui se comporterait peut-être tout autrement si elle était isolée. J'ai déjà donné plus haut un assez grand nombre de détails dont la place naturelle serait ici. Je me bornerai ici à y renvoyer le lecteur (avant tout à la partie sur la „Dépendance de la présence de matières étrangères“, III, 8).

Solubilité. Il est caractéristique pour, je pense, toutes les enzymes connues qu'elles soient solubles dans l'eau. A cet égard, celles que je traite ici ne font pas exception. En effet, j'ai pour ainsi dire toujours opéré avec un extrait aqueux de malt. La question qui se posait, était, cependant, s'il n'y avait pas de dissolvants préférables: n'obtient-on pas une action fermentative plus énergique en préparant les extraits de malt d'une autre manière? Il était tout indiqué d'essayer de faire l'extraction au moyen d'une solution faible d'un des acides qui, d'après les expériences faites, favorisaient la protéolyse. J'ai choisi, à cet effet, l'acide lactique me servant aussi bien de malt vert que de malt touraillé. J'ai essayé aussi l'effet qu'exerce sur le pouvoir fermentatif d'un extrait de malt vert l'addition d'une petite quantité de glycérine (2 p. c.).

(Essais nos. 1155—1170). Le malt employé est du malt touraillé moulu en farine fine et qu'on fait digérer, pendant 2 heures, dans l'armoire glacière, en agitant toutes les 10 minutes, à peu près:

1° 100^{gr} de malt + 400^{gr} d'eau (= edm.-aq.)

2° 100^{gr} de malt + 400^{gr} d'eau acidulée d'acide lactique à 0.2 p. c. (= edm.-lact.).

On ajoute à 10^{cc} des liquides filtrés 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c. contenant 0.4 p. c. et 0.2 p. c. d'acide lactique, de sorte que la concentration de celui-ci, dans le liquide à essayer, est toujours de 0.2 p. c. On précipite pour commencer et au bout de deux heures, à 47°, par l'acide tannique.

	Az total	Az du liquide filtré		Az dédoublé
		pour commencer	au bout de 2 heures à 47°	
	mg	mg	mg	mg
edm.-aq.	10.72	5.90	5.94	0.04
edm.-lact.	11.46	6.82	7.72	0.90
edm.-aq. + protéine	—	—	9.00	3.10
edm.-lact. + protéine	—	—	11.62	4.80

On voit que l'extrait à l'acide lactique était un peu plus riche en azote et qu'il avait un pouvoir fermentatif plus grand que l'extrait aqueux.

(Essais nos. 1775—1798). Malt vert, écrasé, comme à l'ordinaire, et digéré:

1° 3 parties de malt avec 4 parties d'eau (= edm.-aq.)

2° — — — — — et 0.2 p. c. d'acide lactique
(= edm.-lact.)

3° — — — — — et 2 p. c. de glycérine
(= edm.-glyc.)

On laisse reposer pendant 30 minutes à la température ambiante en agitant. On jette sur des filtres qu'on laisse dans l'armoire glacière jusqu'au lendemain. On essaie, comme plus haut, l'action qu'exercent les extraits de malt sur de la protéine de froment à une concentration d'acide lactique à 0.2 p. c. On précipite pour commencer et au bout de 2¹/₂ heures, à 47°, par l'acide tannique.

	Az total	Az du liquide filtré		Az dédoublé
		pour commencer	au bout de 2 ¹ / ₂ heures à 47°	
	mg	mg	mg	mg
edm.-aq.	19.33	9.18	21.14	11.96
edm.-lact.	22.38	11.64	23.32	11.68
edm.-glyc.	18.90	9.28	19.80	10.52

Pratiquement parlant, l'extrait aqueux et l'extrait à l'acide lactique se comportent de la même manière quant au pouvoir fermentatif; le dernier, toutefois, contient plus d'azote total et plus d'azote imprécipitable par le tannin — à cause, sans doute, d'une protéolyse qui s'y est faite pendant l'extraction. L'extrait glycérimien, au contraire, le cède aux deux autres tant à l'égard du pouvoir fermentatif que de la teneur en azote. Mais la différence n'est que minime. — L'enzyme elle-même est donc aussi soluble dans l'eau que dans un liquide faiblement acide ou glycérimien. Le fait que son action est favorisée par l'addition d'acide lactique ne porte nullement sur sa solubilité. (Pour l'influence de la neutralisation passagère d'un extrait de malt à réaction acide v. p. 211).

Nous avons déjà fait remarquer que le précipité obtenu en versant l'extrait de malt vert aqueux et glycérimien dans de l'alcool absolu n'a qu'un pouvoir fermentatif trypsique faible, tandis qu'on pouvait montrer l'existence d'une action pepsique énergique dans la préparation faite de l'extrait glycérimien (v. p. 231 ss.). Un extrait aqueux aurait probablement donné une préparation pepsique tout aussi énergique, mais je n'ai pas fait d'essai direct à ce sujet. Si le pouvoir fermentatif trypsique ne se trouve que peu développé dans ces préparations, on pourrait se figurer que l'enzyme en question restait en solution. Ceci, cependant, n'est que peu probable, parce que le pouvoir fermentatif trypsique est lié à des composés non dialysables (dont nous parlerons plus loin) qui, en ce cas, seraient probablement précipités par l'alcool.

Le produit précipité de l'extrait glycérimien par l'alcool et contenant, à ce qu'il faut croire, l'enzyme et d'autres substances, surtout des substances albuminoïdes et des phosphates, a donné, dissous à l'eau, la réaction du biuret très belle et très forte; mais le chlorure stanneux ne le précipitait pas complètement.

Diffusibilité. La question de savoir si les substances douées de pouvoir fermentatif sont diffusibles ou non est d'un grand intérêt aussi bien pour décider le groupe de substances auquel elles appartiennent que pour comprendre une série d'actions physiologico-chimiques à l'intérieur de l'organisme vivant. La plupart des recherches faites ont abouti à la conclusion que les enzymes ne sont point diffusibles, ou ne le sont que très peu. Comme plusieurs autres raisons indiquent qu'elles ont leur place parmi les composés de protéine, elles sont probablement soit des substances albumines proprement dites, soit, en tout cas, des dérivés de ces substances et des dérivés aussi compliqués, pour le moins, que les albumoses et les composés congénères de celles-ci.

Les essais que j'ai faits avec les enzymes traitées ici viennent confirmer, dans les points essentiels, cette supposition générale. Comme la question présente un très grand intérêt et que mes premiers résultats semblaient indiquer une diffusibilité faible chez les enzymes, j'ai fait deux séries d'essais en me servant d'extraits de malt différents.

I^{re} Série (Essais nos. 1995—2018). Le 5 mai, à 4 heures, j'ai préparé un extrait de malt vert. Le même jour, j'en ai mis 150^{cc} dans une vessie de poisson étanche, que j'ai suspendue dans un vase cylindrique contenant 150^{cc} d'eau distillée. Le tout a été placé dans l'armoire glacière jusqu'à 10 h. du lendemain matin. Il y avait alors 160^{cc} à l'intérieur de la vessie (A) et 140^{cc} au dehors (B). J'ai tiré des échantillons des deux liquides (A et B) pour y doser l'azote total, l'azote échappant à la précipitation par le chlorure stanneux et par l'acide tannique, et pour mesurer le pouvoir fermentatif protéolytique des deux solutions, tant dans le sens pepsique que dans le sens tryptique, les faisant agir, à cette intention, pendant 3 heures, à la température de 50°, sur une solution de protéine.

	Az total	Az du liquide filtré de 10 ^{cc} de protéine + 10 ^{cc} d'edm. précipités par le chlorure stanneux			Az du liquide filtré de 10 ^{cc} de protéine + 10 ^{cc} d'edm. précipités par l'a- cide tannique		
		pour commen- cer	au bout de 3 heures	Az dé- doublé	pour commen- cer	au bout de 3 heures	Az dé- doublé
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
6 mai, A.	12.22	9.40	27.56	18.16	4.84	11.72	6.88
B.	2.22	4.12	4.64	0.52	2.08	2.28	0.20
7 mai, après 24 heures de dia- lyse ultérieure							
A.	10.82	8.84	25.16	16.32	4.08	10.20	6.12
B.	3.64	5.48	5.80	0.32	3.44	3.52	0.08

Il paraît donc que le 6 mai le premier dialysatum, B, avait un tout petit peu de pouvoir fermentatif tant pepsique que tryptique, qui, cependant, le lendemain avait considérablement diminué, malgré l'augmentation considérable de l'azote total du dialysatum. Mais comme il est impossible de fonder des conclusions sûres sur des chiffres aussi petits, j'ai fait les essais nouveaux que voici :

II^e Série (Essais nos. 2151—2170). J'ai préparé l'extrait de malt le 20 mai. Laissé dans un sceau à glace, il est resté parfaitement clair, conservant un pouvoir fermentatif très grand, ainsi que le feront

voir les essais. Le 31 mai, j'en ai placé 200^{cc} dans une vessie, que j'ai plongée dans un vase cylindrique étroit, contenant 100^{cc} d'eau distillée, qui montait à une hauteur telle que le liquide à l'intérieur de la vessie était d'environ 0^{cm}.5 au dessus de celui qui se trouvait au dehors. Pour m'assurer que la vessie était bien étanche, je l'ai suspendue librement à l'air une demi-heure avant de m'en servir, remplie d'eau: pas une goutte n'en est sortie. Le lendemain, 1^{er} juin, le liquide à l'intérieur de la vessie était de 2^{cc}.5 plus haut placé qu'au dehors; le volume était augmenté de 18^{cm}. Pour constater ultérieurement que la vessie était parfaitement étanche, on y a mis, après l'avoir vidée, 175^{cc} de l'extrait de malt primitif, et on l'a plongée dans le vase cylindrique contenant 100^{cc} d'eau. Les surfaces étaient de hauteurs absolument égales à l'intérieur de la vessie et au dehors d'elle. Mais deux jours après (3 juin), la surface à l'intérieur était de 3^{cm} au-dessus de la surface extérieure; le volume de l'eau avait descendu à 75^{cc}. Ceci se passait dans l'armoire glacière.

Aux essais suivants on indique, comme tout à l'heure, le liquide à l'intérieur de la vessie par A, le dialysatum au dehors par B. L'extrait de malt primitif est marqué „edm. prim.“ :

	Az total	Az du liquide filtré de 10 ^{cc} de protéine + 10 ^{cc} d'edm. précipités par le chlorure stanneux		
		pour commencer	au bout de 2 ¹ / ₂ heures à 50°	Az dédoublé
	mg	mg	mg	mg
edm. prim.....	19.37	15.74	42.68	26.94
A	15.87	12.30	38.18	25.88
B	7.48	8.74	8.72	+ 0.02

Par un calcul on trouvera que la somme de l'azote total de A et de B est un peu plus grand qu'à l'extrait de malt primitif:

Az total en 10^{cc} d'A = 15^{mg}.87; soit en 218^{cc} = 345^{mg}.97

— — de B = 7^{mg}.48; — 82^{cc} = 61^{mg}.34

total... 407^{mg}.31; mais

Az total en 10^{cc} d'edm. prim. = 19^{mg}.37 donne en 200^{cc} d'edm. 387^{mg}.40

différence... 19^{mg}.91

d'où s'ensuit que 20^{mg} d'azote environ proviennent de la vessie qui, sans doute, aura aussi été attaquée par les enzymes protéolytiques.

Du reste, il résulte de ces essais que, malgré le pouvoir fermentatif extraordinaire de l'extrait de malt employé et quoique la quantité d'azote diffusée soit plus grande que celle de la série d'essais précédente, aucun pouvoir fermentatif pepsique notable ne se laisse constater au dialysatum, ou qu'aucune enzyme pepsique n'a passé dehors par diffusion.

Si l'on ne considère pas que les résultats de la première série se trouvent au-dedans des limites des erreurs expérimentales, il faut conclure des deux séries que les enzymes protéolytiques d'un extrait de malt ne sont qu'à un degré minime diffusibles à travers une membrane animale comme celle dont on s'est servi ici.

Résistance à des facteurs extérieurs. 1^o Dessèchement. — En examinant l'influence du dessèchement sur les ferments protéolytiques il faut, naturellement, prendre en considération la température à laquelle il se passe. On a donc affaire ici à un facteur double. On sait qu'en préparant le malt, dans la pratique, on finit par lui faire subir un dessèchement soit à l'air, à la température ordinaire (du malt séché à l'air), soit à la touraille, à des températures croissantes qui, comme c'est le cas à la malterie de la brasserie de Gamle Carlsberg, finissent par atteindre 90°—95° (du malt touraillé). On sait encore que, si la température augmente doucement au fur et à mesure que le dessèchement se fait, les préparations d'enzymes supportent une température beaucoup plus élevée (au-dessus de 100°, voir même jusqu'à 150°) que si on les expose subitement, à l'état humide, à une grande chaleur. Il faut donc s'attendre à trouver, dans le malt touraillé, le pouvoir fermentatif conservé. Dans ce qui précède nous avons, à l'occasion, décrit des essais qui montrent qu'il en est ainsi (v. p. 235). Mais je ne puis pas répondre, d'une manière décisive, à cette question: le pouvoir fermentatif protéolytique s'est-il affaibli ou s'est-il peut-être accru (ceci n'est que très peu probable) pendant la torréfaction? En effet, je n'ai pas suivi le pouvoir fermentatif protéolytique du même échantillon de malt pendant les différents stades de la torréfaction dès le malt vert. En général, je n'ai pas attaché d'importance à la comparaison du pouvoir fermentatif de mes divers extraits ou, ce qu'il faudrait ici, du pouvoir fermentatif du malt vert et du malt touraillé. A ce propos je ferai observer qu'à de telles comparaisons on pourra partir d'unités diverses de la force de l'extrait de malt, par exemple, soit de sa richesse en matières sèches, soit de sa richesse en azote, unités qui ne correspondraient peut-être pas toujours les unes aux

autres et qui donneraient, assurément, des résultats variés à l'égard du pouvoir fermentatif. Là où j'ai cherché à comparer le pouvoir fermentatif d'extraits divers — par exemple en examinant l'apparition des enzymes pendant la germination — (v. plus loin V, 1), j'ai pris pour unité la teneur en azote, étant d'avis qu'on obtient ainsi les meilleurs résultats dans ce cas. Aux essais auxquels je vais passer maintenant, les extraits de malt ont été préparés de malt et d'eau dans des proportions différentes. Aussi leur richesse en azote aussi bien que leur pouvoir fermentatif ont-ils beaucoup varié, ce qui peut tenir aux variations individuelles des échantillons de malt.

(Essais nos. 671—680, 1187—1206). Le malt touraillé, finement moulu, est délayé avec des quantités d'eau variées en agitant fréquemment, pendant $\frac{1}{2}$ —1 heure, à la température ordinaire. On le place, jeté sur un filtre, dans l'armoire glacière jusqu'au lendemain. Comme à l'ordinaire, on fait agir le liquide filtré sur une solution de protéine acidulée d'acide lactique.

	Az total de 10 ^{cc} d'edm.	Az du liquide filtré de 10 ^{cc} d'edm. + 10 ^{cc} de protéine, précipités par l'acide tannique		
		pour com- mencer	au bout de 2 heures à 47°	Az dédoublé
	mg	mg	mg	mg
1 partie de malt + 2 parties d'eau . . .	22.06	10.74	22.64	11.90
1 — — 4 — — . . .	13.20	7.00	—	—
1 — — 4 — — . . .	10.29	5.74	9.90	4.16
1 — — 4 — — (bouil- lie)	10.28	5.64	5.62	÷ 0.02

On voit ici un pouvoir fermentatif trypsique très grand à l'extrait préparé de 1 partie de malt + 2 parties d'eau, mais qui, quant à la richesse en azote, ne dépasse que peu les extraits de malt vert ordinaires, tandis que, pour sa teneur en matières sèches, très riches en sucre, il doit les dépasser de beaucoup (le malt vert contient, on le sait, environ 50 p. c. d'eau). Aux échantillons préparés avec une quantité d'eau correspondant aux extraits de malt (1 sur 4), la richesse en azote et le pouvoir fermentatif sont beaucoup moins grands qu'à l'ordinaire et, cela va sans dire, le pouvoir fermentatif est complètement détruit à échantillon bouilli (v. aussi les essais p. 236).

A une autre série d'essais (nos. 881—894), j'ai examiné l'influence qu'a exercée sur le pouvoir fermentatif d'un extrait de malt vert

l'évaporation à sec de l'extrait. On prépare l'extrait, comme à l'ordinaire, de 3 parties de malt sur 4 parties d'eau. Le pouvoir fermentatif trypsique primitif se détermine par l'action sur de la protéine pendant six quarts d'heure, à la température de 45°, le jour même de sa préparation. Du reste, le pouvoir fermentatif n'est pas particulièrement grand. Après l'avoir laissé jusqu'au lendemain dans l'armoire glacière, on en a mis 400^{cc} (9 janvier 1900) dans un ballon de 4 litres. Pour empêcher le débordement de mousse, ce ballon communique avec un autre ballon, renversé, de même volume. On évapore à 20—30^{mm} de pression barométrique. La température à l'intérieur du ballon, oscillant entre 30° et 37°, est, en général, de 31°—32°. Pour commencer, le liquide mousse beaucoup. Au bout de 3 fois 24 heures il ne reste qu'une masse sirupeuse, qu'on évapore dans le vide, à la température de 40°—50° qu'on a grand soin de ne jamais dépasser, jusqu'à ce qu'elle forme une croûte fixe. Pour sortir la croûte, il a fallu séparer le fond du ballon en le coupant. On a desséché la croûte dans le vide sur de l'acide sulfurique, à la température ordinaire, du 12—16 janvier. En la pulvérisant, on en fait une poudre fine de couleur brune. Pour en examiner le pouvoir fermentatif trypsique, on le dissout dans des quantités d'eau diverses, obtenant des solutions très foncées. On en mêle 10^{cc} avec 10^{cc} de la solution ordinaire de protéine. On dose l'azote qui, pour commencer, se soustrait à la précipitation par l'acide tannique, et l'azote qui s'y soustrait au bout de six quarts d'heure.

	Az du liquide filtré de la précipitation par l'acide tannique		
	pour com- mencer	au bout de six quarts d'heure à 45°	Az dédoublé
	mg	mg	mg
Extrait de malt frais.....	7.24	13.52	6.28
4 p. c. d'extrait de la poudre brune	5.64	8.48	2.84
8 p. c. — - — —	10.92	16.08	5.16

On voit qu'un pouvoir fermentatif trypsique relativement grand s'est conservé pendant l'évaporation et le dessèchement prolongés. Mais les données ne suffisent pas pour déterminer l'étendue de l'affaiblissement. Comme, pendant l'évaporation, l'enzyme a trouvé moyen d'agir sur les matières albuminoïdes de l'extrait de malt en les dédoublant pour former des composés imprécipitables par l'acide tannique, les 8 p. c. d'extrait de malt contiennent une quantité d'azote correspondant, à peu

près, à la teneur en azote de l'extrait de malt primitif: l'affaiblissement n'aura été que très petit.

Tout compte fait, on voit que l'enzyme trypsique supporte très bien le dessèchement tant à des températures élevées qu'à des températures basses, et que, par conséquent, elle peut se trouver à l'état actif au malt touraillé comme aux préparations d'extrait de malt faites en évaporant à des températures basses. Il y a tout lieu de croire que l'enzyme pepsique de même supporte le dessèchement, s'étant toujours, jusqu'à présent, montrée plus résistante aux influences des facteurs extérieurs que l'enzyme trypsique. Mais je n'ai pas encore examiné cette question.

2° Nous avons vu qu'aucune des deux enzymes en solution ne supporte ni ébullition ni chauffage au-delà de 70° (v. p. 169 ss. et p. 241).

3° La congélation, au contraire, ne semble pas exercer d'influence nuisible, en tout cas sur l'enzyme trypsique, la seule que j'aie examinée. Il est plutôt possible, par une congélation partielle, de renforcer le pouvoir fermentatif protéolytique d'un extrait de malt, parce que ce n'est qu'une petite partie de l'enzyme qui entre dans la première partie congelée. Les essais suivants ont été faits avec trois extraits de malt différant d'âge. L'âge, cependant, n'a assurément pas exercé d'influence affaiblissante sur le pouvoir fermentatif à cause de la température basse (v. plus loin, p. 246). Mais il faut naturellement compter avec les différences individuelles des trois échantillons de malt.

(Essais nos. 76—87). Les extraits de malt sont préparés de 1 partie de malt vert + 2 parties d'eau. I est congelé complètement. De II, la moitié seulement est congelée. III n'est pas congelé du tout. La fusion se fait dans l'armoire glacière à 4°—5°. 10^{cc} d'extrait de malt + 10^{cc} de solution de protéine.

	Age des extraits de malt	Az du liquide filtré de l'acide tannique			
		pour com- mencer	au bout de 2 heures à 50°	Az dé- doublé	
		mg	mg	mg	
I {	a. moitié fondue la première	96 heures	9.30	15.32	6.02
	b. moitié fondue la dernière	96 —	3.48	4.84	1.36
II {	a. partie non congelée.....	48 —	7.76	13.52	5.76
	b. — congelée	48 —	2.30	3.38	1.08
III	point de congélation.....	24 —	6.64	11.72	5.08

Donc, d'un extrait de malt complètement congelé c'est la partie qui, entre autres, contient l'enzyme trypsique, qui fond la première (I); c'est encore, d'après II, celle qui s'est congelée la dernière. Pourtant la moitié congelée la première (II b) d'un extrait de malt a aussi un pouvoir fermentatif trypsique faible, une partie correspondante de l'azote étant congelée.

4° On a examiné l'influence de la lumière aux essais que voici:

1ère Série (Essais nos. 895—914). 13 mars 1900. Le jour même de sa préparation, c'est à dire aussi tôt qu'une quantité suffisante aura passé par le filtre, on prend, d'un extrait de malt, 3 échantillons. L'un d'eux a été mis, sans délai, dans l'armoire glacière (dans l'obscurité, comme toujours). On verse les deux autres dans des flacons transparents qu'on place entre les carreaux doubles d'une fenêtre, à l'ouest, les y laissant de 3 h. 30 du soir jusqu'au coucher du soleil (à 6 h.). L'un des flacons est couvert d'un capuchon de carton, peint en noir et impénétrable aux rayons de la lumière. L'autre, tout ouvert, est placé sur le capuchon de carton pour que la température des deux flacons puisse être, autant que possible, la même.

	Az du liquide filtré		Az dé-doublé
	pour commencer	au bout de 2 heures à 47°	
	mg	mg	mg
Dans l'échantillon de l'armoire glacière	7.96	18.40	10.44
— — du flacon obscur....	6.44	16.84	10.40
— — du flacon clair.....	6.98 ¹⁾	16.00	9.02

Le ciel était, ce jour-là, particulièrement clair et sans nuages. Le lendemain, il en était de même. Les flacons sont restés, le lendemain, au même endroit jusqu'à 2 heures, donc à la lumière diffuse jusqu'à midi, et pendant deux heures à la lumière solaire directe. On mêle 10^{cc} des différents échantillons avec 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c. et l'on précipite par l'acide tannique pour commencer et au bout de deux heures, ayant laissé les mélanges au bain-marie à 47°.

Le même jour, 14 mars, une partie de l'échantillon laissé dans

¹⁾ Il faudrait s'attendre à trouver les chiffres de cette colonne presque les mêmes. Je ne saurais expliquer pourquoi il n'en est rien. Serait-ce dû à l'intervention de bactéries qui auraient fait d'azote amidé des composés précipitables par l'acide tannique?

l'armoire glacière pendant la nuit, a été placée à la lumière du jour, une autre partie à l'obscurité, comme plus haut, de 2 h. du soir jusqu'au lendemain, lorsqu'on s'en est servi pour les expériences. Voici ce que j'ai trouvé:

	Az du liquide filtré		Az dé-doublé
	pour commencer	au bout de 2 heures à 47°	
	mg	mg	mg
Dans l'échantillon du flacon obscur..	8.20	17.26	9.06
— — du flacon clair....	8.30	16.60	8.30

11^e Série (Essais nos. 2083—2090). 17 mai 1901. Un extrait de malt tout frais est placé dans des vases cylindriques étroits. L'un, couvert d'un capuchon de carton noir, est mis à une fenêtre, à l'ouest, de 3 h. $\frac{1}{2}$ du soir jusqu'au coucher du soleil (vers les 8 h.), et le lendemain, pendant quelques heures du matin, à une fenêtre, au sud, à la lumière solaire forte et directe. Comme le 13—14 mars, il faisait très beau: le ciel était clair et sans nuages. Pour exclure la végétation bactérienne, on a ajouté à chaque échantillon 4 gouttes de toluol. Avant et après les essais on précipite tant par le chlorure stanneux que par l'acide tannique:

	Précipitant	Az du filtrat		Az dé-doublé
		pour commencer	au bout de 2 heures à 50°	
		mg	mg	mg
Dans l'échantillon du vase obscure	le chlor. stann.	12.88	35.08	22.20
— — — —	l'acide tann.	8.92	16.16	7.24
— — — — clair	le chlor. stann.	12.72	34.24	21.52
— — — —	l'acide tann.	9.36	15.84	6.48

Les deux séries d'essais se confirment. Elles montrent que plusieurs heures de lumière solaire directe n'exercent qu'un effet minime — si effet il y a — d'affaiblissement sur le pouvoir fermentatif protéolytique, et que les deux enzymes, la pepsique et la trypsique, se comportent de même, ou à peu près, à cet égard. — Voilà un résultat d'importance pour les plantes sur pied très exposées à la lumière solaire, surtout à

l'âge jeune. Elles pourront donc, aussi au soleil, faire, sans retardation, la dissimilation de leur matières albuminoïdes. Autre chose est que celle-ci s'accuse tout particulièrement dans les plantules qui croissent à l'obscurité par l'entassement d'asparagine, de glutamine, et de substances semblables (Schulze): là, les conditions nécessaires pour la génération de matières protéiques par la combinaison des corps amidés avec les produits non azotés de l'assimilation chlorophyllienne font défaut.

5°. Pour l'influence des acides, des alcalis et des antiseptiques sur les enzymes protéolytiques de l'extrait de malt voir plus haut III, 8 (p. 203 ss). Nous rappellerons seulement qu'en général l'enzyme trypsique se montre beaucoup plus sensible à l'influence de ces substances que l'enzyme pepsique.

6° Sous la notion d'âge nous comprenons un certain nombre de facteurs dont les effets ne se distinguent pas facilement. En disant d'une solution qu'elle est durable ou peu durable, nous entendons seulement indiquer sa force de résistance à des agents avec la présence desquels il faudra compter dans chaque cas particulier. Nommons, par exemple, tous les autres corps solubles qui se trouvent naturellement en présence d'enzymes et qu'en pratique il est impossible d'en séparer. Parmi ces corps, nous citerons les différents sels d'un extrait de malt, ou les composés formés par suite de l'action des enzymes mêmes. Avant tout, il faut y compter les enzymes elles-mêmes, qui pourront peut-être se détruire les unes les autres, ou se détruire elles-mêmes par l'autodigestion. (Ainsi on sait que l'enzyme protéolytique du suc de levûre détruit facilement la zymase par un acte de digestion). Il faut encore compter avec la présence de bactéries qui peuvent directement détruire les enzymes, ou bien former des produits d'assimilation et de dissimilation ou de fermentation qui agissent à leur détriment. — Pour exclure de telles actions, il faut procéder de l'une des deux manières suivantes: ou bien maintenir la solution d'enzyme à une température assez basse pour y supprimer toute transformation chimique, qu'elle soit causée par les enzymes elles-mêmes, par les bactéries ou par n'importe quel autre agent — si l'on y réussit complètement le pouvoir fermentatif pourra, sans doute, se conserver intact pendant un temps illimité — ou bien ajouter des substances qui, comme les antiseptiques, préviennent l'action nuisible des bactéries. Dans le dernier cas, il faut prendre en considération l'influence défavorable que pourra exercer sur l'enzyme l'antiseptique lui-même. En éliminant tous ces facteurs on fait disparaître, à mon avis, „l'influence de l'âge" dont parlent si souvent les auteurs, quand même l'emploi

de ce terme pourra souvent être commode pour s'épargner l'énumération d'un grand nombre de facteurs sous-entendus.

Quant à mes expériences à l'égard de „l'influence de l'âge“, dans le sens du terme que je viens d'indiquer, sur les enzymes protéolytiques de l'extrait de malt, j'ai indiqué plus haut (p. 151—52 et p. 226) l'espace de temps pendant lequel on peut conserver à l'extrait de malt le pouvoir fermentatif en ajoutant du toluol, qui affaiblit toujours un peu, ou en refroidissant à 0°. Plongé dans la glace, l'extrait de malt se conserve presque sans affaiblissement pendant, au moins, plus d'une semaine et, assurément, plus longtemps encore si on a soin de renouveler continuellement la glace. Au contraire, à 4°—5° (dans l'armoire glacière) une fermentation acide se produit au bout de quelques jours, le pouvoir fermentatif se perdant complètement si l'on n'écarte pas les bactéries par l'addition, par exemple, de toluol. Ainsi, par un traitement convenable, l'enzyme pepsique, en particulier, mais aussi l'enzyme trypsique se conservent assez bien en solution. Je n'ai pas examiné jusqu'à quel point l'enzyme pepsique se conserve à l'état solide en précipitant par l'alcool (pour l'enzyme trypsique v. p. 240 ss.).

3. Influence sur des matières protéiques diverses. Points de ressemblance avec la pepsine et la trypsine animales.

Peu à peu on a constaté que l'action de plusieurs enzymes n'est pas aussi spécifique qu'on le supposait d'abord, la même enzyme agissant quelquefois sur des corps assez peu rapprochés, à ce qu'il paraît, les uns des autres. Jusqu'à quel point ce fait nous autorise, comme le veut Emil Fischer, à conclure à un certain accord de la structure moléculaire de ces substances, c'est ce que je ne discuterai pas ici. Mais, en tout cas, il y a intérêt à réunir le plus grand nombre possible de données de ce genre. J'ai donc examiné la manière de se comporter des enzymes protéolytiques de l'extrait de malt vis-à-vis d'un nombre de matières protéiques, partie congénères, partie assez éloignées les unes des autres, du règne végétal, partie enfin, ce qui n'est pas le moins intéressant, d'origine animale. Pour être à même de juger l'extension du dédoublement, j'ai, à titre de comparaison, fait agir, en même temps, de la pepsine et de la trypsine animales sur les mêmes substances. Enfin, dans quelques cas isolés, j'ai aussi fait agir la pepsine animale sur les matières protéiques végétales. Ainsi, on a mêlé ici plusieurs questions qui pourraient bien demander chacune un traitement à part. Mais étant d'avis qu'elles s'éclaircissent les unes les autres, et désirant éviter des répétitions trop nombreuses je les traiterai ensemble.

A ces essais, il y a eu quelquefois des difficultés par suite des différences qui existent entre les points optima de la température et de la concentration d'acide et d'alcali des enzymes animales et les points correspondants des enzymes végétales. Comme, cependant, il est nécessaire, pour faire des comparaisons rationnelles, de faire agir les différentes enzymes aux conditions les plus favorables, j'ai dû, dans quelques-uns de mes essais, avoir égard à cette circonstance. La conséquence en est que les essais de la même série sont faits dans des conditions extérieures un peu différentes.

Ainsi qu'on verra des numéros d'essais, je vais présenter mes séries d'essais dans un ordre un peu différent de l'ordre chronologique auquel elles ont été faites.

1^{re} Série (Essais nos. 1341—1372). On y examine l'influence qu'exerce le même extrait de malt sur les matières albuminoïdes suivantes: les glutines de Kjeldahl de céréales diverses (v. p. 156—57), mais pour lesquelles je préfère employer le nom général de protéines; la légumine de pois, la caséine de commerce de Kahlbaum. Pour les préparations de protéine de froment, d'orge, de malt, je les ai faites moi-même de la manière indiquée p. 153. Mon collègue, M. Carl Pedersen, m'a gracieusement cédé deux préparations de protéine de seigle et d'avoine, ainsi que la légumine. De toutes ces substances j'ai fait des solutions à 2 p. c. dans de l'acide lactique à 0.4 p. c. En les laissant reposer 24 heures à la température ambiante, toutes se sont dissoutes excepté la protéine de malt, la légumine, la caséine. Celle-ci formait un dépôt léger, dont la liqueur surnageante était claire. La légumine formait une gelée épaisse et claire dans laquelle étaient dissimulés des moutons blancs. La protéine de malt, enfin, formait une émulsion opaque d'un brun jaunâtre, sans dépôt (cette préparation n'était pas toute pure). En chauffant au bain-marie, la légumine a donné une solution parfaitement limpide, la caséine une émulsion faible; la protéine de malt est restée telle qu'elle était avant. Comme à l'ordinaire, on emploie 10^{cc} d'un extrait de malt frais et 10^{cc} des solutions de matières protéiques. On fait précipiter pour commencer et au bout de 2 heures, à la température de 47°, par l'acide tannique. Ainsi les résultats ne se rapportent qu'au dédoublement trypsique. (V. tableau p. 249.)

Contre mon attente, c'est sur la protéine de malt que s'exerce l'action la plus faible (à moitié aussi grande que l'action sur la légumine), mais la cause en est peut-être l'impureté déjà nommée de la préparation. Mais la protéine d'orge aussi, très jolie préparation, n'occupe pas de position bien élevée. En effet, la caséine animale et difficilement soluble la dépasse de beaucoup; la protéine de froment

la laisse loin derrière elle. Voilà pourquoi cette dernière paraît un objet très bien choisi pour les recherches sur les actions protéolytiques de l'extrait de malt, sans parler du rendement très fort qu'on en obtient, comparé à celui que fournit la préparation des autres graines. Ce qui est intéressant c'est que les traits de beaucoup les plus grands sont donnés par la légumine, assez éloignée des céréales.

	Az du liquide filtré de la pré- cipitation par l'acide tannique		Az dédoublé	
	pour com- mencer	au bout de 2 h. à 47°	total	de la pro- téine
	mg	mg	mg	mg
10 ^{cc} edm. + 10 ^{cc} d'ac. lactique à 0.4 p. c.	9.30	11.46	2.16	—
— — — de protéine de malt ...	8.90	16.12	7.22	5.06
— — — - - seigle .	9.20	16.88	7.68	5.52
— — — - - d'orge	8.72	16.88	8.16	6.00
— — — - caséine	9.18	18.20	9.02	6.86
— — — - protéine d'avoine...	9.24	19.22	9.98	7.82
— — — - - de froment.	9.04	20.04	11.00	8.84
— — — - légumine	8.92	21.58	12.66	10.50

Donc, l'enzyme trypsique de l'orge en germination, seule enzyme sur laquelle nous renseignent ces essais, est loin d'avoir une action spécifique et exclusive sur les matières albuminoïdes de l'orge. Son action, au contraire, est encore plus forte vis-à-vis d'une série d'autres matières albuminoïdes en partie assez éloignées et même d'origine animale. Il résultera des essais suivants qu'en dehors des substances déjà nommées, il y en a plusieurs autres qui se prêtent à cette action, telles que l'ovalbumine et la fibrine de bœuf. A certains égards, cette enzyme ne le cède pas aux enzymes d'origine animale (la pepsine, la trypsine). Il en est de même de l'enzyme pepsique de l'extrait de malt.

II^e Série (Essais nos. 931—942, 967—994). Je rapproche ici, pour les comparer, des essais faits en deux groupes avec des extraits de malt et des solutions de pepsine diverses (pepsine de Langebek). Les essais avec les extraits de malt sont faits à 47°, ceux avec la pepsine à 40°.

	Az du liquide filtré de la précipitation par l'acide tannique		Az dédoublé
	pour commencer	au bout de 2 heures à 47° ou 40°	
Essais nos. 931-942. Solution de pepsine à 5 p. c. ¹⁾	mg	mg	mg
Protéine de froment-HCl (à 0.36 p. m.)-edm.....	6.48	16.08	9.60
— — — — — -pepsine ..	35.64	43.48	7.84
— — — -acide lactique (à 2 p. m.)-edm...	6.48	16.42	9.94
— — — — — -pepsine	35.64	42.18	6.54
Essais nos. 967-994. Solution de pepsine à 2 p. c.			
Protéine-acide lactique (à 2 p. m.)-edm.	9.00	19.22	10.22
— — — — — -pepsine.....	16.94	19.42	2.48
Caséine — — — — — -edm.	9.00	18.24	9.24
— — — — — -pepsine.....	16.94	20.00	3.06
Protéine-HCl (à 0.9 p. m.)-edm.....	9.08	10.64	1.56
— -acide lactique (à 2 p. m.)-edm.	9.08	19.22	10.14
Protéine-HCl (à 0.9 p. m.)-pepsine	16.94	20.60	3.66
Caséine- — — — — —	16.94	27.66	10.72
Pepsine-HCl (à 0.9 p. m.) seuls	16.76	18.18	1.42
Edm.-acide lactique (à 2 p. m.) seuls.....	9.08	11.54	2.46

Quand même, vu les conditions expérimentales différentes, on n'est pas justifié en comparant directement ces essais, ils donnent, à plusieurs égards, d'intéressantes indications sur lesquelles j'attirerai l'attention. Des essais postérieurs viendront suppléer ceux-ci. Rappelons d'abord que ces essais, auxquels l'acide tannique seul sert de précipitant, ne nous renseignent que sur l'effet de l'enzyme trypsique de l'extrait de malt, tandis qu'on sait que ce n'est que lentement que la pepsine animale pousse le dédoublement au-delà des vraies peptones ou de

¹⁾ Les indications des concentrations d'acides du tableau n'ont pas une valeur absolue aux essais de pepsine les solutions aqueuses de pepsine réagissant toujours acide. En titrant avec de la phénol-phtaléine comme indicateur, on a neutralisé 10^{cc} d'une solution de pepsine à 2 p. c. par 2^{cc}.70 d'hydrate de sodium titré normal au 10°. Aux essais nos. 931—942, auxquels la solution de pepsine était à 5 p. c., l'acidité s'est donc fortement augmentée. Aux essais nos. 967—994, auxquels les concentrations d'acide chlorhydrique étaient plus fortes encore, on aura peut-être déjà dépassé la limite d'acidité la plus favorable.

matières précipitables encore par l'acide tannique¹). Il ne faut donc pas s'étonner que j'aie eu des effets relativement faibles partout, même pour la caséine. — Il paraît que l'action d'une solution de pepsine à 5 p. c. est beaucoup plus forte que celle d'une solution à 2 p. c., résultat auquel il ne fallait guère s'attendre d'après les renseignements que nous donne généralement à ce sujet la littérature. Mais peut-être faut-il chercher, nous venons de le dire, l'explication dans l'acidité plus favorable des premiers essais; peut-être faut-il rapporter le trait plus grand à une autopeptonisation plus énergique, car c'est un fait qu'une autopeptonisation a lieu. Cependant, à la phase révélée ici les extraits de malt ont à tous les essais, tant à ceux avec la protéine qu'à ceux avec la caséine, agi avec plus de force que la pepsine, à part l'essai avec les caséine + pepsine + acide chlorhydrique (à 0.9 p. m.). A une concentration convenable d'acide, l'extrait de malt agit aussi énergiquement sur la caséine que sur la protéine de froment, qui est beaucoup moins fortement attaquée par la pepsine. On est encore frappé de la différence de l'action de la pepsine sur la caséine selon que la solution où l'action se passe contient de l'acide chlorhydrique ou de l'acide lactique: l'action est beaucoup plus faible dans le dernier cas. L'extrait de malt n'agit que très faiblement à l'acide chlorhydrique à 0.9 p. m., concentration très favorable, au contraire, à la pepsine.

Partie pour examiner l'influence qu'exerce l'extrait de malt sur encore une albumine, partie pour voir si la pepsine ne serait pas supérieure à l'extrait de malt aux phases antérieures de la protéolyse (révélées par d'autres précipitants que le tannin), on a fait les essais que voici:

III^e Série (Essais nos. 1487—1540). Comme autrefois, on se sert de protéine de froment et de caséine, mais celle-ci est une préparation de Merck, moins soluble et donnant toujours une émulsion très trouble contenant quelques flocons indissous. De plus, on se sert d'une préparation desséchée d'ovalbumine dont, cependant, la solution contenait à peine 2 p. c. On dissout la protéine de froment dans de l'acide lactique à 0.4 p. c., les deux autres dans de l'acide chlorhydrique à 0.1 p. c., les liquides à essayer contenant ainsi 0.2 p. c. d'acide lactique et 0.05 p. c. d'acide chlorhydrique. On emploie l'extrait de malt ordinaire et une solution à 2 p. c. de pepsine de Langebek. Tous les essais se font à la température de 45° qui se trouve au milieu de la température optima des deux solutions diastases.

¹) V. Salaskin: Zeitschr. f. physiol. Chemie XXXII, 592 (1901). D. Lawrow, *ibid.* XXXIII, 312 (1901). Leo Langstein: Beitr. zur chem. Physiol. und Pathol. I, 507 ss. (1902).

Comme précipitants, on se sert d'acide tannique et de chlorure mercurique (sublimé).

Voici d'abord quelques observations sur la précipitation par le sublimé¹⁾, dont je n'ai pas encore parlé. On emploie une solution presque saturée (à 5—7 p. c.) de chlorure mercurique. Comme celle-ci réagit fortement acide, il est nécessaire de neutraliser avant de précipiter, sans quoi la protéine de froment ne se précipite pas complètement. En prenant pour indicateur la phénol-phtaléine, on fait la neutralisation au moyen d'eau de chaux, qu'on ajoute goutte par goutte par une burette jusqu'à l'apparition du plus faible rouge. On emploie toujours 10^{cc} de la solution de sublimé. Le précipité se déposant vite la liqueur suspendue devient limpide. (Une série d'essais de contrôle m'ont démontré que, par ce procédé, on précipite toute la matière précipitable, de sorte que les liquides filtrés restaient clairs sans donner de précipités ultérieurs en ajoutant encore du sublimé).

Essais nos. 1487—1540	Pré- cipi- tant	Az du liquide filtré		Az dédou- blé
		pour com- mencer	au bout de 2 heures à 45°	
		mg	mg	mg
Protéine de froment-ac. lactique-edm.	Hg Cl ²	9.48	26.00	16.52
— — — — —	tannin	8.90	20.40	11.50
— — — — — pepsine	Hg Cl ²	22.96	35.82	12.86
— — — — —	tannin	16.06	20.90	4.84
Ovalbumine-H Cl-edm.	Hg Cl ²	9.06	12.50	3.44
— — — — —	tannin	9.30	13.62	4.32
— — — — — pepsine	Hg Cl ²	21.36	26.34	4.98
— — — — —	tannin	15.62	20.36	4.74
Caséine-H Cl-edm.	Hg Cl ²	9.50	17.66	8.16
— — — — —	tannin	9.50	17.02	7.52
— — — — — pepsine	Hg Cl ²	22.90	35.22	12.32
— — — — —	tannin	16.30	21.90	5.60

Ces essais font voir qu'à l'action qu'exerce sur la protéine de froment la pepsine, il se forme une quantité considérable de produits qui échappent à la précipitation par le sublimé mais que précipite le tannin (probablement des peptones). Aux essais avec l'extrait de malt, la différence entre ces deux précipitations est beaucoup moins grande.

¹⁾ V. Schjerning: Zeitschr. f. anal. Chemie XXXVII, 413 (1898).

On obtient le même résultat des essais avec la caséine qui, en général dans cette série, est beaucoup plus susceptible de l'action de la pepsine que de celle de l'extrait de malt. L'ovalbumine semble être également résistante aux attaques des deux enzymes: il n'y a guère de différence entre ce qui échappe à l'une ou à l'autre des deux précipitations, à celle par le sublimé ou à celle par le tannin. L'intérêt principal de cette série d'essais se trouve dans les différences entre les précipitations par le sublimé et celles par le tannin: elles nous révèlent — c'est là un point auquel je vais revenir — des phases diverses de la protéolyse. Si on ne se sert comme précipitant que de l'acide tannique pour comparer les effets protéolytiques d'un extrait de malt et d'une préparation de pepsine, on sera facilement induit en erreur; de même que la supériorité générale de l'extrait de malt dans la phase révélée par ce précipitant ne permet aucune conclusion bien sûre sur le pouvoir fermentatif protéolytique des deux solutions. A cet égard, les essais suivants, auxquels on a fait la comparaison avec la trypsine animale pour ce que j'appelle la phase pepsique et la phase trypsique de la protéolyse, auront un intérêt général.

IV^e Série (Essais nos. 2339—2368). — A ces essais, on examine l'action d'un extrait de malt sur la fibrine de bœuf en milieu acide tant qu'en milieu alcalin. A titre de comparaison, je fais agir un extrait de pancréas (de la trypsine) sur la même substance en milieu alcalin. L'extrait de malt est préparé le jour même où on l'applique. Voici comment on le neutralise aux essais qui se font en milieu alcalin: Ayant trouvé que 10^{cc} d'extrait demandent 2^{cc}.4 d'hydrate de sodium titré normal au 10° pour produire, par de la phénolphtaléine, une teinte rouge reconnaissable, on additionne à 97^{cc}.6 d'extrait de malt 2^{cc}.4 d'hydrate de sodium titré normal. Puis, on s'en sert tout de suite, sans enlever par filtration le précipité faible produit par la neutralisation. Pour la fibrine et l'extrait de pancréas, je les ai reçus le même jour, 13 décembre, par un grand froid, tout frais du laboratoire du professeur Bohr. Je m'en suis servi tout de suite à mes essais. J'ai eu deux échantillons de l'extrait aqueux de pancréas, dont l'un saturé de chloroforme. Celui-ci a servi aux essais prolongés (24 heures), l'autre, sans chloroforme, aux essais courts (2 heures). Les deux ont réagi alcalin. Avant de servir, la fibrine, se trouvant dans de l'eau de chloroforme, est pressée, rincée à l'eau à plusieurs reprises, pressée de nouveau et à la fin entre du papier à filtrer, enfin coupée en petits morceaux. On ne pèse pas ce qu'on en prend pour chaque essai, mais, par approximation, on en fait entrer la même quantité à tous les essais. On porte dans des fioles avec 10^{cc} d'acide lactique à 0.4 p. c. et avec 10^{cc} de carbonate de sodium

trait d'une couche épaisse de toluol, je l'ai abandonné à lui-même à 42°—43° (A). Le même jour, des filaments fibrineux ont été introduits dans un extrait pancréatique à 0.12 p. c. de soude avec du chloroforme, à la même température (B). Le 16 décembre, les filaments fibrineux d'A étaient tombés en flocons qui, pour la plupart, s'étaient déposés sous la forme de précipité. En B, toute la fibrine était dissoute, et le liquide presque limpide. Au courant des jours suivants, le précipité d'A allait toujours en disparaissant sans avoir complètement disparu à la fin du mois de janvier de 1902. Le troisième jour, B était parfaitement limpide tout en donnant un mince dépôt blanchâtre. Les 16, 17, 19, 20, 26, 30 décembre, les 16 et 20 janvier, on a essayé si B donnait la réaction de tryptophane en acidulant avec de l'acide acétique et en ajoutant quelques gouttes de brome, mais toujours avec un résultat négatif: on n'obtenait qu'un précipité jaune et insoluble dans l'alcool amylique, sans teinte violette aucune. Mais lorsque, le 16 janvier, j'ai essayé la réaction aussi à l'extrait de malt contenant la fibrine et auquel je ne m'attendais pas à un résultat positif, il s'est produit une réaction de tryptophane extrêmement belle et très prononcée donnant avec de l'acide acétique et l'eau de brome une teinte violette foncée, absorbée par l'alcool amylique. Il m'est impossible d'expliquer pourquoi l'essai de la trypsine ne donnait pas cette réaction, mais si elle se montre d'une manière si prononcée à l'essai de l'extrait de malt, on est en droit d'y voir l'effet d'une action tryptique véritable, amenant la formation de la protéine-chromogène si caractéristique à la digestion tryptique.

4. Les produits de dédoublement protéolytiques.

La chimie organique moderne n'a guère de domaine où l'incertitude soit aussi grande qu'à la caractérisation et à la systématisation des matières protéiques diverses et de leurs produits de dédoublement primaires (albumoses, peptones). On ne sait guère ce qu'en chaque cas il faudra considérer comme matières protéiques proprement dites. On se demande si l'on n'a affaire qu'à une partie de la molécule d'albumine primitive, ou s'il s'agit d'un composé de celle-ci et d'une autre substance, un soi-disant groupe prosthétique ou chaîne latérale (A. Kossel¹⁾) de nature organique ou inorganique. La raison en est qu'on n'a aucun criterium sûr de la matière protéique pure, pas même dans

¹⁾ A. Kossel: Ueber den gegenwärtigen Stand der Eiweisschemie. Vortrag geh. vor der Deutsch. chem. Gesellsch. 1. Juni 1901. Ber. d. d. chem. Gesellsch. XXXIV, 32 (14. Okt. 1901).

les cas, assez fréquents aujourd'hui, où on peut la faire cristalliser. Ainsi différentes albumines, la sérumalbumine, l'ovalbumine, la lactalbumine forment des cristaux isomorphes (Wichmann¹⁾), tandis que leur composition élémentaire diffère tellement que toute identité entre elles est hors de question. D'autre part, la composition élémentaire de cristaux de la même matière albuminoïde (l'oxyhémoglobine, l'ovalbumine, l'édestine du chènevis) présente quelquefois des variations tellement grandes qu'il n'y a pas moyen d'en tirer des conclusions sur la composition de la substance à l'état pur (Fr. N. Schulz²⁾). Quelquefois même on ignore comment distinguer les vraies matières protéiques de leurs produits de dédoublement primaires.

Aussi se fonde-t-on, en ce moment, pour distinguer entre les divers groupes de matières albuminoïdes ou leurs produits de dédoublement, sur des propriétés plus ou moins constantes: 1° leur composition élémentaire, surtout leur teneur en azote (en soufre, en phosphore); 2° leurs propriétés physiques (solubilité, coagulabilité, conditions de précipitation, diffusibilité, pouvoir rotatoire, etc.); 3° leurs produits de dédoublement sous l'influence d'acides, d'alcalis, d'enzymes, etc.; 4° leur manière de se comporter vis-à-vis de précipitants chimiques; 5° leur réactions de coloration.

Si on désire connaître l'action qualitative d'une enzyme protéolytique, c'est à dire savoir quels sont les produits de dédoublement qui se forment pendant son action sur les matières albuminoïdes qu'elle est à même de transformer, on verra vite qu'il est difficile de donner une réponse quelque peu satisfaisante à cette question. D'abord, il est possible, vraisemblable même que son action sur les diverses matières protéiques (par exemple sur celles nommées plus haut) est quantitativement et qualitativement différente. Puis, on n'est jamais sûr que les matières protéiques dont on part, soient des individus chimiques à l'état pur. Enfin, tant qu'on n'aura pas produit l'enzyme même à l'état de pureté, une partie des produits trouvés (ainsi ceux qui se manifestent par des réactions de coloration déterminées) pourra provenir de la préparation d'enzyme même.

De plus, une protéolyse — comme celle traitée ici — qui conduit le dédoublement des matières albuminoïdes au-delà des peptones à la formation de bases hexoniques, amides, amines, etc., est une action extrêmement compliquée. Il est vrai qu'on y trouve des com-

¹⁾ A. Wichmann: Ueber die Krystalformen der Albumine. Zeitschr. f. physiol. Chemie XXVII, 592 (1899).

²⁾ Fr. N. Schulz: Die Krystallisation von Eiweissstoffen und ihre Bedeutung für die Eiweisschemie. Gustav Fischer. Jena. 1901.

trait d'une couche épaisse de toluol, je l'ai abandonné à lui-même à 42°—43° (A). Le même jour, des filaments fibrineux ont été introduits dans un extrait pancréatique à 0.12 p. c. de soude avec du chloroforme, à la même température (B). Le 16 décembre, les filaments fibrineux d'A étaient tombés en flocons qui, pour la plupart, s'étaient déposés sous la forme de précipité. En B, toute la fibrine était dissoute, et le liquide presque limpide. Au courant des jours suivants, le précipité d'A allait toujours en disparaissant sans avoir complètement disparu à la fin du mois de janvier de 1902. Le troisième jour, B était parfaitement limpide tout en donnant un mince dépôt blanchâtre. Les 16, 17, 19, 20, 26, 30 décembre, les 16 et 20 janvier, on a essayé si B donnait la réaction de tryptophane en acidulant avec de l'acide acétique et en ajoutant quelques gouttes de brome, mais toujours avec un résultat négatif: on n'obtenait qu'un précipité jaune et insoluble dans l'alcool amylique, sans teinte violette aucune. Mais lorsque, le 16 janvier, j'ai essayé la réaction aussi à l'extrait de malt contenant la fibrine et auquel je ne m'attendais pas à un résultat positif, il s'est produit une réaction de tryptophane extrêmement belle et très prononcée donnant avec de l'acide acétique et l'eau de brome une teinte violette foncée, absorbée par l'alcool amylique. Il m'est impossible d'expliquer pourquoi l'essai de la trypsine ne donnait pas cette réaction, mais si elle se montre d'une manière si prononcée à l'essai de l'extrait de malt, on est en droit d'y voir l'effet d'une action trypsique véritable, amenant la formation de la protéine-chromogène si caractéristique à la digestion trypsique.

4. Les produits de dédoublement protéolytiques.

La chimie organique moderne n'a guère de domaine où l'incertitude soit aussi grande qu'à la caractérisation et à la systématisation des matières protéiques diverses et de leurs produits de dédoublement primaires (albumoses, peptones). On ne sait guère ce qu'en chaque cas il faudra considérer comme matières protéiques proprement dites. On se demande si l'on n'a affaire qu'à une partie de la molécule d'albumine primitive, ou s'il s'agit d'un composé de celle-ci et d'une autre substance, un soi-disant groupe prosthétique ou chaîne latérale (A. Kossel¹⁾) de nature organique ou inorganique. La raison en est qu'on n'a aucun criterium sûr de la matière protéique pure, pas même dans

¹⁾ A. Kossel: Ueber den gegenwärtigen Stand der Eiweisschemie. Vortrag geh. vor der Deutsch. chem. Gesellsch. 1. Juni 1901. Ber. d. d. chem. Gesellsch. XXXIV, 32 (14. Okt. 1901).

les cas, assez fréquents aujourd'hui, où on peut la faire cristalliser. Ainsi différentes albumines, la sérumalbumine, l'ovalbumine, la lactalbumine forment des cristaux isomorphes (Wichmann¹⁾), tandis que leur composition élémentaire diffère tellement que toute identité entre elles est hors de question. D'autre part, la composition élémentaire de cristaux de la même matière albuminoïde (l'oxyhémoglobine, l'ovalbumine, l'édestine du chènevis) présente quelquefois des variations tellement grandes qu'il n'y a pas moyen d'en tirer des conclusions sur la composition de la substance à l'état pur (Fr. N. Schulz²⁾). Quelquefois même on ignore comment distinguer les vraies matières protéiques de leurs produits de dédoublement primaires.

Aussi se fonde-t-on, en ce moment, pour distinguer entre les divers groupes de matières albuminoïdes ou leurs produits de dédoublement, sur des propriétés plus ou moins constantes: 1° leur composition élémentaire, surtout leur teneur en azote (en soufre, en phosphore); 2° leurs propriétés physiques (solubilité, coagulabilité, conditions de précipitation, diffusibilité, pouvoir rotatoire, etc.); 3° leurs produits de dédoublement sous l'influence d'acides, d'alcalis, d'enzymes, etc.; 4° leur manière de se comporter vis-à-vis de précipitants chimiques; 5° leur réactions de coloration.

Si on désire connaître l'action qualitative d'une enzyme protéolytique, c'est à dire savoir quels sont les produits de dédoublement qui se forment pendant son action sur les matières albuminoïdes qu'elle est à même de transformer, on verra vite qu'il est difficile de donner une réponse quelque peu satisfaisante à cette question. D'abord, il est possible, vraisemblable même que son action sur les diverses matières protéiques (par exemple sur celles nommées plus haut) est quantitativement et qualitativement différente. Puis, on n'est jamais sûr que les matières protéiques dont on part, soient des individus chimiques à l'état pur. Enfin, tant qu'on n'aura pas produit l'enzyme même à l'état de pureté, une partie des produits trouvés (ainsi ceux qui se manifestent par des réactions de coloration déterminées) pourra provenir de la préparation d'enzyme même.

De plus, une protéolyse — comme celle traitée ici — qui conduit le dédoublement des matières albuminoïdes au-delà des peptones à la formation de bases hexoniques, amides, amines, etc., est une action extrêmement compliquée. Il est vrai qu'on y trouve des com-

¹⁾ A. Wichmann: Ueber die Krystalformen der Albumine. Zeitschr. f. physiol. Chemie XXVII, 592 (1899).

²⁾ Fr. N. Schulz: Die Krystallisation von Eiweissstoffen und ihre Bedeutung für die Eiweisschemie. Gustav Fischer. Jena. 1901.

posés beaucoup mieux caractérisés que les corps nommés tout à l'heure. En effet, pour un grand nombre d'entre eux on en connaît les formules constitutives, ils forment des cristaux typiques ou des combinaisons peu solubles. Mais il est parfaitement impossible, par les méthodes analytiques modernes, de faire simultanément à un essai de protéolyse des déterminations quantitatives et qualitatives de toutes ces substances ou même de quelques-unes d'entre elles. Il n'y a guère personne — moi moins que tout autre — qui soit assez présomptueux pour s'imaginer de pouvoir résoudre cette question. En cherchant de contribuer un peu à la solution du côté qualitatif de la question de la protéolyse c'est exprès que je me suis tracé les limites les plus étroites: au lieu de rechercher en détail quelles sont les substances caractéristiques produites pendant l'action des enzymes en question, je me suis borné à tâcher de les distinguer par groupes au moyen de l'emploi de précipitants divers ou de la dialyse. D'autre part, je n'ai guère attaché d'importance aux réactions de coloration pour la distinction des groupes qualitativement différents. Aussi ne me suis-je servi de cette méthode que par occasion et à côté d'autres méthodes.

Je n'ai point essayé de déterminer les produits de dédoublement très profonds cristallins en les préparant à l'état pur. Mais ce qui, pour moi, présente ici le plus grand intérêt théorique et pratique c'est d'abord de constater la quantité et la nature des produits de dédoublement primaires formés (albumoses, peptones), comparés à tous les autres composés pris ensemble (bases hexoniques, corps amidés, etc.), puis d'examiner les variations des rapports de tous ces composés, amenées par la variation des conditions expérimentales. Pour obtenir ces renseignements, je me suis servi: 1° de quelques-uns des précipitants qui, d'après les indications de la littérature, précipitent telle substance et ne précipitent pas telle autre; 2° de la diffusion.

Hâtons-nous d'ajouter que les savants sont loin d'être d'accord sur les substances précipitables par chaque précipitant, et que, naturellement, les conditions de précipitation jouent le plus grand rôle à cet égard. Mais que le sens que j'attribue à mes résultats soit vrai ou faux — ce qui leur donne de la valeur c'est, à mon avis, qu'autant que possible mes précipitations ont toujours été faites aux mêmes conditions, que je me suis toujours servi de la même matière albuminoïde (la protéine de froment) employant des extraits de malt préparés de la même manière, et qu'en variant les conditions de l'action de l'enzyme de la même série d'essais, j'ai déterminé quantitativement l'azote qui, au même temps, s'est soustrait à la précipitation par des précipitants divers. Mes résultats ont, en tout cas, ainsi une valeur relative.

A. Emploi simultané de plusieurs précipitants.

Dans ce qui précède nous avons cité des séries d'essais auxquelles on s'est servi, pour précipiter, de chlorure stanneux et d'acide tannique à la fois; une série à laquelle, en outre, on a employé du sulphate de zinc et de l'acétate uranique, ainsi que de la magnésie pour la distillation d'ammoniaque (v. p. 189—90); une série, enfin, où c'est le chlorure mercurique qui a servi de précipitant (p. 252). Tout en revenant, dans la suite, sur les résultats de ces essais je renvoie, pour les manipulations, aux parties précédentes.

Il me reste ici à décrire encore une méthode de précipitation, dont je n'ai pas parlé plus haut: la précipitation par l'acide phosphotungstique. Je me sers d'une solution de cette substance à 10 p. c. dans de l'acide chlorhydrique à 5 p. c. On commence par rechercher la quantité nécessaire pour opérer une précipitation complète dans l'extrait de malt et dans la solution de la protéine de froment de la concentration ordinaire. On voit que 10^{cc} d'extrait de malt + 10^{cc} de solution de protéine de froment donnent la même précipitation complète par 10^{cc}, 20^{cc} ou 30^{cc} d'acide phosphotungstique: c'est à dire l'additionnement de cet acide au liquide filtré ne donne ni précipité ni opacité. Aussi emploie-t-on toujours 20^{cc} de la solution d'acide phosphotungstique. On étend d'eau, comme à l'ordinaire, jusqu'à 50^{cc}, et le dosage d'azote se fait pour la moitié du liquide filtré.

I^{re} Série (Essais nos. 1373—1400): Précipitation par le sulfate de zinc, par l'acide tannique (tan.) et par l'acide phosphotungstique (ph.-tg.) dans 10^{cc} d'extrait de malt et dans 10^{cc} d'extrait de malt + 10^{cc} de solution de protéine de froment. Les précipitations sont faites au commencement de l'essai, et au bout de 2 heures à 47°:

Azote total de 10^{cc} d'edm. = 19^{mg}.62.

	Précipitant	Az du liquide filtré		Az dédoublé
		pour commencer	au bout de 2 heures à 47°	
		mg	mg	mg
10 ^{cc} d'edm.....	Zn SO ⁴	"	"	"
— —	tan.	9.68	12.62	2.94
— —	ph.-tg.	7.28	8.28	1.00
10 ^{cc} d'edm. + 10 ^{cc} de prot...	Zn SO ⁴	12.72	24.86	12.14
— — — — ..	tan.	9.66	19.46	9.80
— — — — ..	ph.-tg.	6.40	10.66	4.26

On voit donc que les trois précipitants précipitent des quantités très différentes de l'azote total. Mais avant d'en discuter le sens, je vais citer encore quelques autres essais.

II^e Série (Essais nos. 1405—1442). Mêmes précipitants qu'à la série précédente. Mais les essais sont faits à des températures différentes; ils sont arrêtés au bout de 3 heures:

Az total de 10^{cc} d'edm. = 19^{mg}.21.

	Précipitant	Az du liquide filtré		Az dédoublé
		pour commencer	au bout de 3 heures à la température de	
10 ^{cc} d'edm. + 10 ^{cc} de prot.	Zn SO ⁴	mg 10.76	mg 11.96	mg 1.20
— — — —	tan.	9.32	4° 9.46	0.14
— — — —	ph.-tg.	6.24	6.40	0.16
— — — —	Zn SO ⁴	10.76	19° 14.20	3.44
— — — —	tan.	9.32	11.42	2.10
— — — —	ph.-tg.	6.24	6.80	0.56
— — — —	Zn SO ⁴	10.76	31° 19.24	8.48
— — — —	tan.	9.32	16.04	6.72
— — — —	ph.-tg.	6.24	9.74	3.50
— — — —	Zn SO ⁴	10.76	47° 25.64	14.88
— — — —	tan.	9.32	21.94	12.62
— — — —	ph.-tg.	6.24	12.88	6.64
— — — —	Zn SO ⁴	10.76	60° 20.16	9.40
— — — —	tan.	9.32	17.02	7.70
— — — —	ph.-tg.	6.24	10.44	4.20

On n'a pas construit de courbes de ces chiffres directement; mais on pourra comparer les planches XIII et XIV de la série suivante; on y trouvera les résultats des précipitations par l'acide phosphotungstique de cette série-ci, marqués par une ligne ponctuée.

III^e Série (Essais nos. 1561—1612). On y opère aux mêmes températures qu'à la II^e série en se servant, cependant, de deux autres précipitants: du chlorure stanneux et du sublimé, ainsi que du sulfate de zinc et de l'acide tannique, mais sans se servir de l'acide phosphotungstique. La durée est de 3 heures.

Az total de 10^{cc} de solution de protéine: 33^{mg}.22
 — — — 10^{cc} d'edm.: 20^{mg}.40
 en tout: 53^{mg}.62

	Précipi- tant	Az du liquide filtré		Az dédoublé
		pour com- mencer	au bout de 3 heures à la température de	
10 ^{cc} d'edm. + 10 ^{cc} de prot.	Sn Cl ²	mg 15.84	mg 21.18	mg 5.34
— — — —	Hg Cl ²	9.86	4° 11.40	1.54
— — — —	Zn SO ⁴	11.60		12.10
— — — —	tan.	10.04	10.54	0.50
— — — —	Sn Cl ²	15.84	19° 28.90	13.06
— — — —	Hg Cl ²	9.86		16.02
— — — —	Zn SO ⁴	11.60	14.56	2.96
— — — —	tan.	10.04	13.28	3.24
— — — —	Sn Cl ²	15.84	31° 40.12	24.28
— — — —	Hg Cl ²	9.86		23.80
— — — —	Zn SO ⁴	11.60	21.76	10.16
— — — —	tan.	10.04	20.34	10.30
— — — —	Sn Cl ²	15.84	47° 43.86	28.02
— — — —	Hg Cl ²	9.86		29.70
— — — —	Zn SO ⁴	11.60	27.62	16.02
— — — —	tan.	10.04	24.94	14.90
— — — —	Sn Cl ²	15.84	60° 42.98	27.14
— — — —	Hg Cl ²	9.86		24.76
— — — —	Zn SO ⁴	11.60	23.60	12.00
— — — —	tan.	10.04	19.98	9.94

Ces résultats sont aussi représentés graphiquement sur les planches XIII et XIV. Sur la première, les courbes sont dressées d'après les chiffres de la quatrième colonne du tableau (Az du liquide filtré au bout de 3 heures). On voit ainsi comment, à un moment donné, les différents précipitants divisent l'azote du liquide à essayer total à des températures variées. L'autre planche nous montre la quantité d'azote, exprimée en chiffres absolus, dédoublée, pendant le temps d'essai, aux températures variées, de manière à se soustraire à la précipitation par les mêmes précipitants (v. les chiffres de la cinquième colonne du tableau). Mais que les résultats s'expriment de manière ou d'autre, on verra que la courbe du sublimé, celle du sulfate de zinc et celle de l'acide tannique courent, pour ainsi dire, parallèlement et à peu de distance l'une de l'autre. La courbe du chlorure stanneux, au contraire, passe très loin des autres. De 47°—60°, elle passe parallèlement à l'axe des abscisses. Ce fait indique que le temps d'essai relativement long (3 heures) a suffi pour que, même à la température

moins favorable de 60°, la réaction ait pu aller aussi loin qu'à la température plus favorable de 47°, à laquelle elle serait essentiellement finie avant l'expiration des 3 heures (comp. essais p. 263). Les extraits de malt de cette série et ceux de la série précédente ayant, à peu près, la même teneur en azote et le même pouvoir fermentatif si l'on regarde les précipitations par le sulfate de zinc et l'acide tannique, on est en droit, en quelque façon, d'introduire, à titre de comparaison, la courbe de l'acide phosphotungstique de la II^e Série, ainsi qu'on l'a fait aux planches XIII et XIV. On a ainsi une vue claire de la manière dont les différents précipitants divisent l'azote d'un liquide à essayer comme celui employé ici, après que les enzymes protéolytiques y ont exercé leur action pendant un certain temps, à des températures diverses.

Ce qui, à cette série d'essais, offre le plus d'intérêt, à mon avis, c'est la hauteur à laquelle atteint la courbe de chlorure stanneux (à 47° et à 60°), ainsi que la grande distance entre cette courbe et les autres courbes. Quelques questions se sont alors présentées que j'eus envie d'approfondir: 1° l'action révélée par la courbe de chlorure stanneux a-t-elle atteint son maximum au bout des 3 heures et, sous ce chef, combien de l'azote encore précipitable à ce moment faut-il croire originaire de la protéine, combien de l'extrait de malt employé? 2° un temps d'essai plus long aura-t-il pour effet de rapprocher de plus en plus les différentes courbes? Les deux séries suivantes contribueront à éclaircir ces points:

IV^e Série (Essais nos. 1613—1668). En dehors d'essais avec le mélange ordinaire de protéine de froment et d'extrait de malt, on a fait des essais d'autodigestion avec des extraits de malt seuls, additionnés de leur volume d'eau à 0.4 p. c. d'acide lactique. Comme précipitants on ne se sert que de chlorure stanneux et de sulfate de zinc. Les températures sont les mêmes qu'à la série précédente (seulement 33° au lieu de 31°). On arrête les essais au bout de trois heures. A la température de 47°, cependant, j'en ai fait durer quelques-uns 4 et 5 heures.

Les résultats sont indiqués au tableau ci-dessous (p. 263) et par les courbes de la Pl. XV. Voici ce qu'ils nous apprennent:

L'action révélée par la précipitation par le chlorure stanneux a réellement atteint son maximum, à très peu près, au bout des 3 heures (v., du reste, la série suivante). Plus de la moitié (3^{mg}.66 sur 6^{mg}.84) de l'azote précipitable encore au bout de 5 heures se trouve dans l'extrait de malt même. Du reste, les transformations dans ce sens qui se sont faites de la 3^e à la 5^e heure ne dépassent pas ce qu'on pourra attribuer aux erreurs expérimentales (à la 3^e heure: 15^{mg}.24; à la 4^e heure: 15^{mg}.24; à la 5^e heure: 15^{mg}.44). La petite distance

qu'il y a entre les courbes de chlorure stanneux et celles de sulfate de zinc aux essais avec les extraits de malt seuls, démontrent qu'aux essais avec la protéine de froment les substances qu'il faut mesurer par cette distance, doivent être formées, pour la plupart, de cette protéine.

Az total de 10^{cc} de solution de protéine: 33^{mg}.74
 — — — 10^{cc} d'edm.: 19^{mg}.10
 total: 52^{mg}.84

	Préci- pitant	Az du liquide filtré		Az dédoublé
		pour commen- cer	au bout de 3 heures à la tem- pérature de	
		mg	mg	mg
10 ^{cc} d'edm. + 10 ^{cc} de prot.	Sn Cl ³	16.20	4° { 22.38	6.18
— — — —	Zn SO ⁴	10.44	11.20	0.76
— — — —	Sn Cl ³	16.20	19° { 29.72	13.52
— — — —	Zn SO ⁴	10.44	13.02	1.58
— — — —	Sn Cl ³	16.20	33° { 42.86	26.66
— — — —	Zn SO ⁴	10.44	21.36	10.92
— — — —	Sn Cl ³	16.20	45.04	28.84
— — — —	Sn Cl ³	16.20	47° { 44.84 (4 hs.)	(28.64) (4 hs.)
— — — —	Sn Cl ³	16.20	46.00 (5 -)	(29.80) (5 -)
— — — —	Zn SO ⁴	10.44	26.60	16.16
— — — —	Sn Cl ³	16.20	60° { 40.32	24.12
— — — —	Zn SO ⁴	10.44	18.60	8.16
10 ^{cc} d'edm.	Sn Cl ³	12.70	4° { 13.06	0.36
— — — —	Zn SO ⁴	10.20	10.52	0.32
— — — —	Sn Cl ³	12.70	19° { 13.52	0.82
— — — —	Zn SO ⁴	10.20	11.38	1.18
— — — —	Sn Cl ³	12.70	33° { 13.48	0.78
— — — —	Zn SO ⁴	10.20	12.76	2.56
— — — —	Sn Cl ³	12.70	15.24	2.54
— — — —	Sn Cl ³	12.70	47° { 15.24 (4 hs.)	(2.54) (4 hs.)
— — — —	Sn Cl ³	12.70	15.44 (5 -)	(2.74) (5 -)
— — — —	Zn SO ⁴	10.20	13.80	3.60
— — — —	Sn Cl ³	12.70	60° { 14.24	1.54
— — — —	Zn SO ⁴	10.20	12.70	2.50

V^e Série (Essais nos. 1711—1776). La marche des essais a été décrite en détail p. 189—91. Nous nous bornons ici à rappeler que les précipitants étaient le chlorure stanneux, le sulfate de zinc, l'acide

tannique et l'acétate uranique, et qu'on avait distillé de l'ammoniaque par de la magnésie calcinée. Les essais s'étendaient de 1 à 48 heures. Pour plus de clarté, je réimprime le tableau des résultats renvoyant à la Pl. V et à l'explication partielle des essais, donnée p. 191—92.

Az total de 10^{cc} de solution de protéine: 31^{mg}.46
 — — — 10^{cc} d'edm.: 18^{mg}.84
 total: 50^{mg}.30

Nos. 1711—1776	Chlorure stanneux		Sulfate de zinc		Acide tannique		Acétate uranique		Magnésie	
	Az en milli-grammes		Az en milli-grammes		Az en milli-grammes		Az en milli-grammes		Az en milli-grammes	
	du filtrat	dédouble par heure	du filtrat	dédouble par heure	du filtrat	dédouble par heure	du filtrat	dédouble par heure	du liquide distillé	formé par heure
Au bout de 0 heures	15.62	—	11.60	—	10.48	—	9.64	—	1.06	—
— - 1 —	40.40	24.78	18.64	7.04	16.96	6.48	20.12	10.48	1.35	0.29
— - 2 —	42.36	1.96	24.28	5.64	21.16	4.20	24.84	4.72	—	—
— - 3 —	43.76	1.40	25.24	0.96	23.52	2.36	26.74	1.90	2.84	0.75
— - 4 —	43.72	+0.04	28.54	3.30	24.80	1.28	27.24	0.50	—	—
— - 5 —	43.76	0.04	30.04	1.50	25.80	1.00	28.80	1.56	—	—
— - 6 —	44.68	0.92	31.52	1.48	27.04	1.24	29.00	0.20	3.42	0.19
— - 9 —	45.16	0.16	34.12	0.87	31.16	1.37	32.20	1.07	—	—
— - 12 —	45.28	0.04	37.96	1.28	34.96	1.27	33.92	0.57	4.48	0.17
— - 24 —	45.76	0.04	40.44	0.21	38.04	0.26	—	—	4.76	0.02
— - 48 —	45.32	+0.02	43.88	0.15	41.08	0.13	38.28	0.12	5.20	0.02

B. Essais de diffusion.

Voici ce que j'ai essayé de déterminer: 1^o la quantité d'azote diffusible, formée par suite de l'action d'un extrait de malt sur la protéine de froment, pendant un temps donné, à la température optima des enzymes; 2^o la différence de l'azote non diffusible avant et après cette action (la protéolyse) à l'égard du pouvoir de coagulation et vis-à-vis de dissolvants tels que l'eau et l'acide lactique ou de précipitants tels que le chlorure stanneux et l'acide tannique.

Voici la marche de l'essai: dans un extrait de malt frais et dans une solution de protéine on dose l'azote total et l'azote qui, dès le commencement, se soustrait aux précipitations par le chlorure stanneux et par l'acide tannique. On prend deux portions de 50^{cc} d'extrait de malt + de 50^{cc} de solution de protéine chaque. On chauffe l'une d'elles (l'échantillon passif) tout de suite, l'autre (l'échantillon actif) au

bout de 3 heures seulement, pendant environ 10 minutes, à 90°, pour détruire les enzymes protéolytiques. Aux deux échantillons, le chauffage fait séparer de la matière albuminoïde coagulée, provenant de l'extrait de malt. On place chaque échantillon dans une vessie de poisson bien étanche, qu'on suspend dans de grands vases cylindriques (d'un litre), remplis d'eau distillée jusqu'au niveau de la surface du liquide à l'intérieur de la vessie. La compression du contenu de la vessie rend d'autant plus grande la membrane de diffusion. Pour prévenir le développement bactérien, on verse dans la vessie de l'aldéhyde formique, opération qu'on répète chaque fois qu'on change l'eau distillée des vases cylindriques, ce qui se fait, généralement, tous les deux jours. On recueille soigneusement les liquides dialysés. On les évapore dans des capsules plates après l'addition de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Enfin, on en dose l'azote¹⁾. La dialyse ayant duré du 17 au 31 mai (1901), on ouvre les vessies en les coupant pour en retirer le contenu, ce qui se fait sans difficulté. On filtre les deux échantillons: le filtrat de l'échantillon actif est limpide comme de l'eau; celui de l'échantillon passif est opalisant; il ne traverse que lentement le filtre. On dilue à un volume déterminé (350^{cc}); puis on fait les dosages cités plus bas²⁾. Le contenu non dissous est traité, en chauffant, par 100^{cc} d'acide lactique à 4 p. c. Une partie des deux échantillons se dissout ainsi; mais relativement peu de l'échantillon actif. Dans ces solutions acidulées d'acide lactique on fait les

¹⁾ Ne connaissant pas d'avance la quantité d'azote des premiers dialysata, mais supposant qu'elle était trop grande pour convenir à la méthode de Kjeldahl, j'ai opéré de la façon suivante: on fait digérer, pendant 7 heures, le résidu de l'évaporation avec 20^{cc} d'acide sulfurique concentré et 6 spatules d'oxyde cuivrique. On oxyde en ajoutant 5—6 spatules de permanganate de potassium. Le contenu des fioles se fige en formant une masse solide d'un gris rouge qui, plus tard, ne se fait dissoudre dans l'eau qu'en chauffant. Jetée sur un filtre, la solution passe dans une fiole jaugée de 200^{cc}. Le liquide filtré est clair et d'une teinte faiblement verdâtre (de manganates). Après avoir soigneusement lavé les oxydes manganiques restés sur le filtre, on remplit jusqu'au trait. Pour les dosages de l'azote, on prend $2 \times 50^{\text{cc}}$ du filtrat. On reporte le liquide filtré aux oxydes manganiques dans la fiole qui a servi à la digestion avec l'acide sulfurique concentré. On ajoute quelques gouttes de cet acide et de l'acide oxalique solide. Le liquide, devenu clair, est distillé avec de l'hydrate de sodium: les oxydes manganiques ne contiennent pas d'azote.

²⁾ On n'est pas en droit d'attribuer de valeur exacte aux précipitations faites dans cette solution fortement diluée, les conditions de précipitation étant tout autres qu'à l'ordinaire. Ceci est le cas surtout pour la précipitation par le chlorure stanneux.

dosages de l'azote total et de la quantité d'azote qui échappe à la précipitation par le chlorure stanneux et par l'acide tannique. On dose l'azote des résidus insolubles dans l'acide lactique avec celui des filtres (lavés) employés.

Voici les résultats des essais:

Le liquide à essayer contenait à l'origine:

en 10 ^{cc} d'extrait de malt	18 ^{mg} .46 d'Az, soit: en 50 ^{cc} d'extrait	92 ^{mg} .30 d'Az
en 10 ^{cc} de solut. de prot.	30 ^{mg} .30 — — — 50 ^{cc} —	151 ^{mg} .50 —
total en 100 ^{cc} d'extrait		243 ^{mg} .80 d'Az

De cette quantité on a précipité par le chlorure stanneux	173 ^{mg} .80 —
— — — — — l'acide tannique . . .	199 ^{mg} .20 —
— — — ont diffusé au courant de quinze jours	60 ^{mg} .92 —

Nous venons de dire, p. 264—65, qu'une portion de 100^{cc} (50^{cc} d'edm. + 50^{cc} de prot.) a été chauffée, pendant 10 minutes, à 90° (l'échantillon passif). Une autre portion, toute pareille, a été chauffée de la même manière, mais seulement après avoir été laissée à 50° pendant 3 heures (l'échantillon actif). Puis, les deux échantillons ont été soumis à la dialyse pendant quinze jours.

Voici la marche de la dialyse:

					à l'échantillon passif	à l'échantillon actif
Quantités diffusées du 15 au 17 mai					44 ^{mg} .16 d'Az	84 ^{mg} .96 d'Az
— — — 17 — 19 —					9 ^{mg} .00 —	25 ^{mg} .96 —
— — — 19 — 21 —					2 ^{mg} .74 —	9 ^{mg} .20 —
— — — 21 — 23 —					1 ^{mg} .52 —	5 ^{mg} .85 —
— — — 23 — 25 —					1 ^{mg} .10 —	4 ^{mg} .40 —
— — — 25 — 29 —					^(4 × 24 hs) 1 ^{mg} .44 —	5 ^{mg} .92 —
— — — 29 — 31 —					0 ^{mg} .96 —	2 ^{mg} .80 —
total					60 ^{mg} .92 d'Az	139 ^{mg} .09 d'Az

Ainsi la dialyse n'est pas menée à bout, ce que — au point de vue théorique — elle ne serait qu'après un espace de temps infini. C'est surtout de l'échantillon actif qu'une quantité sensible d'azote aurait encore diffusé, si on avait fait continuer la dialyse.

Si l'on construit les courbes de ces deux séries de chiffres (v. Pl. XVI), on verra qu'elles seront presque parallèles. Elles permettraient de calculer, approximativement, la quantité d'azote diffusible, restée aux vessies à l'arrêt de l'essai. Mais en s'en tenant aux chiffres cités, trouvés directement, on verra que la quantité d'azote, rendue diffusible au courant des 3 heures, à 50°, est considérable

(78^{mg}.07). Réduite au volume du liquide à essayer ordinaire (20^{cc}), elle sera égale à 15^{mg}.61 d'azote ou à la quantité, au moins, qui, pendant le même temps, se soustrait à la précipitation par l'acide tannique (v. par exemple, le tableau p. 261).

En dosant l'azote, resté aux vessies à l'arrêt de la dialyse, on trouve:

	à l'échantillon passif mg	à l'échantillon actif mg
Az soluble dans l'eau, mais non diffusible	92.40	65.10
- insoluble — — , soluble dans l'acide lactique	24.40	2.88
- — — — , insoluble — — —	53.60	22.48
	170.40	90.46
en y ajoutant l'Az diffusible	60.92	138.99
on aura en tout	231.32	229.45 ¹⁾

Ces chiffres font voir que, pendant la protéolyse, une quantité considérable de l'azote se trouvant à l'origine au liquide à essayer à l'état soluble, mais non diffusible, est devenue diffusible, et que l'azote, originairement coagulable, et, après la coagulation (en chauffant à 90°, pendant 10 minutes), insoluble dans l'eau et dans l'acide lactique, a été changé en azote soluble et non coagulable.

Voici les résultats des précipitations faites (après la dialyse), nous venons de le dire, par le chlorure stanneux et par l'acide tannique aux parties du contenu des vessies se trouvant déjà en solution ou qu'on a dissoutes en les traitant par l'acide lactique:

	la précipitation par le chlorure l'acide stanneux tannique donne	
	mg	mg
A l'échantillon passif:		
de 92 ^{mg} .40 d'Az, soluble dans l'eau, non diffusible...	11.76	86.52
- 24 ^{mg} .40 — insoluble — — , soluble dans l'a-		
cide lactique	19.12	23.12
A l'échantillon actif:		
de 65 ^{mg} .10 d'Az, soluble dans l'eau, non diffusible...	6.30	60.62
- 2 ^{mg} .88 — insoluble — — , soluble dans l'a-		
cide lactique	1.76	2.88

¹⁾ Si ces deux chiffres ne s'accordent pas avec le chiffre de l'azote total de la série primitive (243^{mg}.80), il faut se rappeler le grand nombre de sources d'erreurs provenant du grand nombre de déterminations de petites parties des diverses fractions. Toutes ces petites erreurs monteront bien aux 10^{mg}—12^{mg} qui font défaut. D'avance on ne pourrait pas s'attendre à un accord plus grand.

La dilution très grande (v. p. 265) ayant totalement changé les conditions de précipitation il ne faut pas, sans doute, attribuer aux chiffres trouvés une valeur trop grande. Il me semble, cependant, intéressant de constater que l'acide tannique précipite presque complètement tout l'azote soluble qui n'est pas sorti par diffusion. Les différences pourraient bien correspondre, à peu près, à la quantité d'azote qui, quoique diffusible, n'était pas encore sortie par diffusion au moment de l'arrêt de la dialyse.

Les renseignements sur la nature des produits de dédoublement protéolytiques que nous donnent tous ces essais de précipitation et de diffusion, nous permettraient, sans doute, de tirer des conclusions assez importantes de mes essais, rapprochés des résultats auxquels sont arrivés d'autres investigateurs à l'égard de la séparation de substances, ou de groupes de substances divers, au moyen des méthodes employées ici. Mais la littérature vaste qui ne contient, malheureusement, que trop de contradictions, vous rappelle à la prudence, quand il est question de tirer des conclusions. Si quelque savant a cru trouver dans un précipitant une méthode apte à séparer certaines substances, un autre savant n'a pas tardé à paraître, croyant pouvoir affirmer que ce précipitant divise d'après des lignes de démarcation tout autres si, par exemple, on se sert d'une autre substance comme objet d'expérience, ou si les conditions de précipitation varient en quelque point. Or, comme la protéine de froment, la matière protéique qui fait l'objet de mes essais, n'a pas été examinée à fond au sujet des produits de dédoublement qu'elle fournit sous l'action d'agents divers, je suis d'avis que le moment n'est pas encore venu de faire des comparaisons étendues et détaillées entre mes résultats et ceux que d'autres ont trouvés à l'égard d'autres matières albuminoïdes en se servant des mêmes précipitants que moi. Je me bornerai donc, en groupant les produits de dédoublement protéolytiques, à tracer quelques lignes de démarcation, en m'appuyant essentiellement sur les points sur lesquels on est généralement d'accord.

Quant à l'emploi du chlorure stanneux comme précipitant, on n'a rien publié que je sache, à ce sujet, que ce qu'a communiqué Schjerring dans une série de mémoires¹⁾. C'est, du reste, à mon avis le savant qui a examiné à fond, avec le plus de soin et avec le plus de système, la valeur de différents précipitants pour opérer la séparation des matières albuminoïdes et de leurs produits de dédoublement, tout

¹⁾ A la Fresenius' Zeitschr. f. anal. Chemie. Voir les citations p. 162.

particulièrement là où il est question de tracer les lignes de démarcation entre leurs groupes principaux. Je me bornerai donc, pour la plupart du temps, à citer les indications de ce savant, quand même je ne me sens pas d'accord avec lui sur tous les points.

Le chlorure stanneux ne précipite, d'après Schjerning, que les matières albuminoïdes proprement dites, et encore pas toutes ces matières, en supposant que les termes dont il se sert d'Albumine I et d'Albumine II ne couvrent que celles-là, l'Albumine II n'étant pas précipitable. Si, comme je l'ai dit aux pages 155 et 162, en parlant de la préparation de protéine de froment dont je me sers, il n'y a eu que 95 p. c. de précipités, il faudrait peut-être expliquer ce fait par la supposition que la préparation n'était pas uniforme, mais qu'elle contenait aussi 5 p. c. d'autres substances. Naturellement, il est hors de question que, pendant la protéolyse, une albumine proprement dite se dédouble en une autre albumine. Si l'albumine se soustrait, peu à peu, à la précipitation par le chlorure stanneux, la cause en est un dédoublement qui est, sans doute, aux premiers stades, une hydrolyse. Il n'y a pas là formation de syntonines¹⁾. Ce qui le montre c'est que ce dédoublement ne se fait pas aux températures au-dessus de 70° (v. p. 173). Je n'ose affirmer qu'à partir du moment où le chlorure stanneux ne précipite plus, nous soyons arrivés à la formation d'albumoses, quoique je sois d'avis qu'on pourrait aussi bien se servir de ce terme que d'un autre, tant que les albumoses ne sont pas mieux caractérisées. Sous cette réserve, je dirai dans la suite — comme je l'ai fait une ou deux fois dans ce qui précède — que les courbes de chlorure stanneux tracent la ligne de démarcation entre les matières albuminoïdes proprement dites et les albumoses. S'il en est ainsi, le chlorure stanneux et le sulfate de zinc, l'autre précipitant dont on s'est servi assez souvent dans ces essais, nous auront fourni les moyens de mesurer directement et, ainsi, de suivre la formation d'albumoses pendant la protéolyse. En effet, à ce que je sais, tous les savants sont d'accord pour admettre que le sulfate de zinc en solution saturée distingue, tout comme les sulfates d'ammonium et de magnésium, les albumoses des vraies peptones, ou plutôt qu'on distingue ces substances par leur manière de se comporter vis-à-vis de ces précipitants qui ne précipitent pas les vraies peptones.

C'est A. Bömer²⁾ qui, la première fois en 1895 seul et, plus

¹⁾ D'après O. Cohnheim (Chemie der Eiweisskörper, Braunschweig 1900, p. 88) les syntonines ou acidalbumines donnent les mêmes réactions de précipitation et de coloration que les matières albuminoïdes proprement dites.

²⁾ A. Bömer: Zeitschr. für analytische Chemie XXXIV, 562 (1895).

tard, conjointement avec K. Baumann¹⁾, a montré cet accord entre le sulfate d'ammonium et le sulfate de zinc dans leur rapport aux albumoses. Ceci est d'une importance d'autant plus grande qu'en se servant du sulfate de zinc on évite de faire la correction d'azote qui est la conséquence de l'emploi du sulfate d'ammonium. Plus tard, les indications de Bömer ont été confirmées par E. Zunz²⁾. De même Schjerning³⁾ a obtenu les mêmes résultats en employant le sulfate de zinc et le sulfate de magnésium. Aujourd'hui plusieurs savants se servent du sulfate de zinc qui, en ce moment, est sur le point de prendre la place du sulfate d'ammonium aux dosages d'albumoses.

Le désaccord, au contraire, est plus grand sur la valeur du sublimé. Suivant W. Kühne⁴⁾ et R. Neumeister⁵⁾, par exemple, il précipite complètement tous les produits de dédoublement de nature protéique, y compris les peptones. Suivant Schjerning⁶⁾, il entraîne aussi les sels ammoniacaux d'acides organiques. Mais comme aux essais que j'ai faits⁷⁾ il a donné des précipitations moins complètes que le sulfate de zinc, ne précipitant même pas toutes les albumoses, je n'ose pas, des indications de la littérature, tirer de conclusions sur la nature de l'azote qu'il précipite.

La littérature n'est pas plus riche en renseignements sur la valeur de la précipitation par l'acide tannique. J. Sebelien⁸⁾ est, je crois, celui qui a traité ce précipitant le plus à fond. Il se sert (d'après Almén⁹⁾) d'une solution de 4^{gr} de tannin en 190^{cc} d'alcool à 40—50 p. c. additionné de 8^{cc} d'acide acétique à 25 p. c. Il donne comme résultat de ses recherches, entre autre, ce qui suit: „Aussi complète qu'est la précipitation par l'acide tannique dans les solutions de matières albuminoïdes proprement dites aussi peu complète est-elle quand on a affaire aux matières de la nature des peptones tant aux vraies peptones qu'aux albumoses¹⁰⁾“, et encore: „la peptone pure se dissout complètement dans l'acide tannique en excès.“ Toute bien

¹⁾ A. Bömer und K. Baumann: Zeitschr. f. Unters. der Nahrungs- u. Genussmittel, I, 106 (1898).

²⁾ E. Zunz: Zeitschr. f. physiol. Chemie XXVII, 219 (1899) et XXVIII, 132 (1899).

³⁾ H. Schjerning: Zeitschr. f. anal. Chemie XXXV, 296 (1896).

⁴⁾ W. Kühne: Zeitschr. f. Biologie XXII, 423 (1885).

⁵⁾ Rich. Neumeister: ibid. XXVI, 234 (1890).

⁶⁾ H. Schjerning: Zeitschr. f. anal. Chemie XXXIX, 553 (1900).

⁷⁾ J'y ai suivi la méthode de Schjerning, neutralisant avec de l'eau de chaux avant la précipitation.

⁸⁾ J. Sebelien: Danske Vidensk. Selskabs Oversigt 1888 p. 81—126 et Zeitschr. f. physiol. Chemie XIII, 142 (1888).

⁹⁾ Almén: Upsala läkars förenings förhandlingar, 1870.

¹⁰⁾ J. Sebelien: Videnskabernes Selskabs Oversigt 1888, p. 94.

fondée que soit cette observation pour les substances avec lesquelles a opéré Sebelien (produits de dédoublement¹ d'ovalbumine, de caseïne, de lactalbumine), ces résultats ne se laissent guère généraliser. J'ai observé moi-même que l'acide tannique en excès redissout une partie du précipité d'un extrait de levûre (levûre soumise à l'autodigestion contenant un grand nombre de produits de dédoublement protéolytiques). Mais les essais que j'ai faits pour trouver les limites approximatives des précipitations par l'acide tannique (pour ces essais v. p. 157—60) ont clairement démontré que, dans le cas en question (les produits de dédoublement de la protéine de froment), aucune partie de l'azote une fois précipité ne se redissout, pas même dans un grand excès d'acide tannique. Ceci ne tient pas à ce que j'ai employé une solution aqueuse d'acide tannique (à 5 p. c.): c'est ce qui résulte des essais déjà nommés avec l'extrait de levûre, où la même solution a servi.

Contrairement encore à ce que pense Sebelien, je suis d'avis que l'acide tannique précipite assez complètement tant les albumoses que les peptones, celles, en tout cas, avec lesquelles j'ai opéré. Un coup d'œil sur les courbes (Pls. XIII et XIV) montre que l'acide tannique précipite toujours une quantité plus grande que celle précipitée par le sulfate de zinc, et une comparaison avec les précipitations par l'acétate uranique, auxquelles je reviendrai tout à l'heure, fait croire qu'il faut regarder que la précipitation par l'acide tannique indique la ligne de démarcation entre les deux groupes de dédoublement de la protéine de froment et de l'extrait de malt: les produits de dédoublement encore de nature protéique (produits pepsiques) et ceux plus profonds (les trypsiques). Cette considération est encore supportée par mes essais de dialyse (v. p. 267), auxquels l'acide tannique précipite, pour ainsi dire, tout l'azote en solution mais qui n'est pas sorti par diffusion de la vessie.

Il faut dire, cependant, que Schjerning¹) qui, entre autre, a opéré aussi avec du moût (mais non pas, c'est vrai, avec un extrait de malt vert et de la protéine de froment) se déclare d'accord avec Sebelien, étant d'avis que, quantitativement, l'acide tannique ne précipite que des matières albuminoïdes proprement dites. — Ce que je peux prouver incontestablement c'est que l'assertion qui veut que l'acide tannique en excès redissolve ce qui a été déjà précipité, n'est pas exacte pour mes essais. Mais, autrement, ceux-ci ne fournissent pas la preuve exacte de la précipitation de toutes les albumoses et de toutes les peptones, quoiqu'il me semble que la marche de mes courbes,

¹) H. Schjerning: Zeitschr. für anal. Chemie XXXIX, 562 (1900).

surtout si on les compare à d'autres courbes de précipitation, parle fortement en faveur d'une telle supposition. Mais on ne peut guère douter que les courbes d'acide tannique ne découvrent une phase relativement profonde de la protéolyse et qui se trouve tout près de la limite entre les peptones et les produits de dédoublement de nature non protéique.

D'après Schjerning¹⁾, l'acétate uranique précipite tous les composés de nature protéique en progressant à partir des peptones, et encore, en présence d'une grande quantité de phosphates, quelques substances de nature non protéique telles que l'asparagine, l'arginine, la piperazine. Aux essais (nos. 1711—1776, v. p. 264) auxquels je me suis servi de ce précipitant, le courbe d'acétate uranique (v. Pl. V) coïncide, pendant les 3—4 premières heures, à peu près, avec la courbe de sulfate de zinc; elle est plus hautement placée (la précipitation est moins grande) que la courbe d'acide tannique. Au bout de trois heures et demie, elle s'incline en descendant de la courbe de sulfate de zinc; au bout de 10 heures environ, elle vient couper la courbe d'acide tannique qui, tout le temps, est presque parallèle à la courbe de sulfate de zinc; enfin, au bout de 48 heures, elle se trouve autant au-dessous de la courbe d'acide tannique que celle-ci est alors au-dessous de la courbe de sulfate de zinc. L'extrait de malt contient un certain nombre de phosphates, mais le moût en contient autant. D'après Schjerning²⁾, la quantité des phosphates de l'extrait de malt n'est pas assez grande pour amener la précipitation de corps non protéiques: en général, l'acétate uranique tracera la ligne de démarcation entre ceux-ci et les peptones. S'il en est ainsi, et quand même un petit nombre de corps amidés et de bases hexoniques se précipitent, la précipitation par l'acétate uranique séparera, à peu près, tout comme la précipitation par l'acide tannique, les produits de dédoublement se trouvant au-dessus et au-dessous des peptones.

C'est une supposition générale³⁾ que l'acide phosphotungstique, outre les corps protéiques, précipite plusieurs produits de dédoublement plus profonds (bases hexoniques, monoamines, ammoniacque, etc.). Aussi ai-je trouvé la courbe de l'acide phosphotungstique située beaucoup plus bas que les courbes de tous les autres précipitants employés, et encore tellement au-dessous de la courbe d'acide tannique que la différence ne pourra pas provenir de l'ammoniacque seule, mais qu'elle doit être attribuée aussi aux autres produits de dédoublements cristallins.

¹⁾ H. Schjerning: *Zeitschr. f. anal. Chemie* XXXIX, 545 (1900).

²⁾ H. Schjerning: *Zeitschr. f. anal. Chemie* XXXIX, 556 (1900).

³⁾ V., entre autre, Fr. Kutscher: *Zeitschr. f. physiol. Chemie* XXXI, 215 (1900).

La distillation par la magnésie renseignera sur la quantité d'azote dédoublé en ammoniacque. En effet, la distillation dure trop peu de temps (10 minutes) pour que la magnésie employée ait pu faire distiller de l'azote qui n'y fût pas d'avance sous forme d'ammoniacque.

D'après ce qui précède, on saurait déterminer, au moyen de précipitants divers, combien, pendant une protéolyse, il se forme d'albumoses (la différence des précipitations par le chlorure stanneux et le sulfate de zinc), de peptones (la différence entre le sulfate de zinc et l'acide tannique ou l'acétate uranique), de produits de dédoublement plus profonds (corps amidés, bases hexoniques, ammoniacque, etc.: ce qui se soustrait à la précipitation par l'acide tannique, ou par l'acétate uranique). Enfin, l'emploi fréquent et simultané que j'ai fait plus haut du chlorure stanneux et de l'acide tannique aurait servi à trouver des expressions approximatives des actions pepsique et trypsique (dans le sens dont je me sers de ces termes) pendant la protéolyse.

Si donc on regarde une série d'essais tels que les essais nos. 1711—1776 (v. p. 264 et Pl. V) à laquelle on a suivi la protéolyse, pendant 48 heures, au moyen de quatre précipitants différents et de la distillation par la magnésie, on est frappé de l'intensité et de la rapidité de la formation d'albumoses, qui a atteint son maximum au bout de 3—4 heures en même temps que les peptones ne paraissent qu'en petit nombre. En effet, elles ne semblent se montrer que comme une formation de transition à un dédoublement plus profond et qui se continue jusqu'à ce que tout l'azote, transformable par cette action, soit dédoublé de manière à se soustraire à la précipitation par l'acide tannique aussi bien que par l'acétate uranique, tandis qu'en même temps des quantités considérables se sont transformées en ammoniacque.

Les essais, faits à des températures diverses, montrent encore que les différentes actions se passent toujours aux mêmes rapports, à peu près, entre elles les différentes courbes de précipitation étant presque parallèles. La courbe de chlorure stanneux seule paraît dévier un peu des autres, ce qui provient, nous l'avons dit, de ce que la durée (3 heures) de l'essai a été un peu trop longue pour faire la détermination de cette courbe, dont le parcours exact a été déterminé avant à une durée plus courte (v. p. 173). Ce qui est important, c'est que la formation d'albumoses est vive déjà aux températures très basses de 4° et de 19°, tandis que les autres actions ne prennent l'essor qu'au-delà de 19°—20°. Aux essais avec l'extrait de malt seul (sans protéine de froment), il n'y a qu'une très petite distance entre la courbe de chlorure stanneux et la courbe de sulfate de zinc, distance

que des températures plus favorables restreignent encore davantage (v. essais nos. 1613—1668, Pl. XV). Ceci fait supposer que, déjà pendant la germination, la plupart des matières azotées de l'extrait de malt ont atteint, ou à peu près, le point de dédoublement auquel, en général, elles peuvent arriver; et que, du moins au bout de 3 heures, à une température favorable à la protéolyse, il y aura très peu d'albumoses et de peptones par suite du dédoublement ultérieur de celles-ci. —

Les essais de diffusion semblent confirmer, d'une manière brillante, les essais de précipitation. Ils servent d'appui aux conclusions que j'ai tirées de ces derniers. Au commencement de l'essai il y a, en 100^{cc} de liquide à essayer, 243^{mg}.80 d'azote total, dont 70^{mg} échappant à la précipitation par le chlorure stanneux (provenant surtout des 50^{cc} d'extrait de malt qui contiennent 92^{mg}.30 d'azote total). Au bout de 3 heures, à 50°, le liquide à essayer a subi un changement tel qu'au courant de quinze jours l'échantillon actif fait passer par diffusion 78^{mg}.07 de plus que l'échantillon passif. Au même temps, une autre partie de l'azote, sans doute encore plus grande celle-là (un dosage exact a été impossible dans ce cas) a subi un dédoublement de sorte qu'elle n'est plus précipitée par le chlorure stanneux, mais précipitée presque complètement par l'acide tannique. Ce qui sort par diffusion sera donc, pour la plupart du temps, des composés cristallins avec un petit nombre de peptones, tandis que les albumoses seront surtout retenues à la vessie.

V.

Première apparition et formation des enzymes.

1. Stade de germination.

Suivant Windisch et Schellhorn¹⁾, l'orge crue („rohe Gerste“) contient déjà, en petite quantité, une enzyme protéolytique, et l'orge mal recueillie ou riche en matières protéiques en contient des quantités notables. Pendant le mouillage, aucune augmentation sensible de la teneur en enzyme n'a lieu, mais elle se fait dès le commencement de la germination, allant en croissant jusqu'à ce que la plantule soit verte. La formation d'enzyme se fait plus vite aux orges riches en matières protéiques qu'à celles qui sont pauvres en ces substances.

¹⁾ Windisch und Schellhorn: Wochenschr. für Brauerei XVII, 452 (1900).

Ayant, à plusieurs reprises, cherché en vain, au moyen de la précipitation par l'acide tannique, de constater une action d'enzyme protéolytique dans l'orge crue, j'ai fait une série d'essais assez longue pour trouver le stade du maltage où apparaît cette action. Je n'y ai employé que la précipitation par l'acide tannique. Je n'ai donc suivi que le développement de l'enzyme trypsique. Peut-être serais-je arrivé à des résultats pareils à ceux de Windisch et Schellhorn si je m'étais servi d'une autre méthode (v. plus loin, p. 279: Proenzymes).

J'ai pris mes échantillons à la malterie pneumatique de la brasserie de Gamle Carlsberg en trois parties, les 6, 12, 18 novembre 1900, mais toujours en avérant que c'était le même échantillon d'orge (marque „Kerteminde“, poids hollandais 115) à des stades de germination divers.

Voici comment on a pris les échantillons:

Le 6 novembre, échantillons

O de grains séchés à l'air.

I de grains au bout de 24 hs. de trempé (5 nov. à 11 h. jusqu'au 6 nov. à 11 h.)

II — — - 48 - — (4 — — — 6 — —)

III — — - 72 - — (3 — — — 6 — —)

directement après la sortie des bacs de la trempé)

IV — — - 24 - de germin. (2 nov. à 11 h. jusqu'au 6 nov. à 11 h.)

V — — - 48 - — (1 — — — 6 — —)

Le 12 novembre.

VI de grains au bout de 72 - — (6 — — — 12 — —)

VII — — - 96 - — (5 — — — 12 — —)

VIII — — - 120 - — (4 — — — 12 — —)

IX — — - 144 - — (3 — — — 12 — —)

X — — - 168 - — (2 — — — 12 — —)

XI — — - 192 - —

Comme, à l'ordinaire, on interrompt la germination à la malterie au neuvième jour, on a, pour la faire continuer dans ce cas-ci, mis les échantillons dans des tamis. On a enfoncé ceux-ci dans les tas de malt, de manière à les faire traverser par la même quantité d'air que celle qui passe à travers tout l'autre malt. De plus, les tamis ont été retournés aux mêmes heures que l'autre malt. La germination s'est continuée ainsi encore pendant 120 heures. On a pris des échantillons

XII de grain au bout de 216 hs. de germ. (9 nov. à 11 h. jusqu'au 18 nov. à 11 h.)							
XIII	—	—	240	—	(8	—	18
XIV	—	—	264	—	(7	—	18
XV	—	—	288	—	(6	—	18
XVI	—	—	312	—	(5	—	18

La richesse en eau et en matières sèches varie, naturellement, beaucoup d'un échantillon à l'autre. Aussi a-t-il été nécessaire d'en faire la détermination pour chaque échantillon. Voici le procédé employé: on met les échantillons humides, sortis des bacs de la trempe, sur un entonnoir avec du papier à filtrer, les couvrant d'une plaque de verre. Aussitôt que l'eau se sera égouttée on pèse la quantité de grains entiers qui doivent servir au dosage des matières sèches. On fait celui-ci comme à l'ordinaire en chauffant dans le vide à 105°, jusqu'à ce que le poids ne change plus.

Mais pour avoir un extrait aqueux propre à servir, on a dû traiter les différents échantillons de manières un peu variées le concassage ordinaire au hachoir ne pouvant servir à tous. Le grain séché à l'air a été moulu en poudre fine. Les échantillons II—IV ont d'abord passé trois fois par un hachoir, puis on les a ultérieurement écrasés et pilés en les travaillant bien dans un mortier. Les échantillons V et VI étant déjà, après avoir passé par le hachoir, à l'état de bouillie n'ont pas été ultérieurement écrasés. Le restant des échantillons a, par ce traitement, pris la même consistance que les matériaux avec lesquels j'opère généralement en préparant mes extraits de malt.

Pour rendre, autant que possible, également „forts“ les extraits, il a fallu ajouter des quantités diverses d'eau aux divers échantillons. J'ai toujours ajouté la quantité qui, d'après mes calculs, était trois fois la quantité de matières sèches de l'échantillon me basant, pour mon calcul, sur des dosages antérieurs semblables. Après être remués à plusieurs reprises, les échantillons sont placés dans l'armoire glacière jusqu'au lendemain. Puis on remue encore quelques fois. Les échantillons II—IV sont pressés à la presse. Les autres sont jetés de suite sur des filtres. Pour chaque extrait, on fait deux essais parallèles sur l'influence qu'ils exercent sur une solution de protéine acidulée d'acide lactique, en agissant pendant 2 heures à 47°. Avant et après cette durée, on précipite par l'acide tannique. Pour chaque extrait, on détermine encore l'azote total de 10^{cc} ainsi que l'azote qui se soustrait à la précipitation par l'acide tannique. Ainsi que font voir les chiffres cités, la force des différents extraits varie beaucoup par rapport à la teneur en azote. Pour faire la comparaison de leur pouvoir fermentatif protéolytique, il a été nécessaire de le calculer d'après la même

teneur en matières sèches ou en azote. Il me semble le plus naturel de prendre pour base de la comparaison la teneur en azote. Aussi au tableau ci-dessous ai-je tout calculé comme pour un extrait de malt contenant, en 10^{cc}, 15^{mg} d'azote total, quantité trouvée à l'extrait de malt vert tout fait, ce qui, sans doute, a augmenté démesurément, pour les extraits peu riches en azote, les erreurs de titrage. On verra les résultats par le tableau suivant et, graphiquement, à la Pl. XVII.

Essais nos. 1239—1340	eau	en 10 ^{cc} d'extrait		en 10 ^{cc} d'extrait + 10 ^{cc} de prot.	Az dédoublé	
		Az total	Az du filtrat	Az du filtrat après 2 hs. à 47°	trouvé directe- ment	calculé pour un extr. de malt cont. 15mg d'Az en 10 ^{cc}
	p. c.	mg.	mg.	mg.	mg.	mg.
O grains séchés à l'air..	16.37	9.68	2.88	2.92	0.04	0.06
I mouillage de 24 hs...	39.39	3.80	1.92	2.08	0.16	0.63
II — - 48 - ..	43.17	3.88	1.82	2.08	0.26	1.00
III — - 72 - ..	44.91	3.78	1.96	1.90	(÷ 0.06)	(÷ 0.24)
IV germination de 24 hs.	45.58	4.45	2.26	2.52	0.26	0.87
V — - 48 -	45.96	6.34	3.12	3.36	0.24	0.57
VI — - 72 -	45.92	6.50	2.96	3.20	0.24	0.55
VII — - 96 -	47.96	10.54	5.40	7.58	2.18	3.10
VIII — - 120 -	47.79	14.18	7.46	12.56	5.10	5.40
IX — - 144 -	48.10	15.17	7.68	14.64	6.96	6.87
X — - 168 -	48.42	14.87	7.74	13.78	6.04	6.09
XI — - 192 -	49.35	15.00	7.22	13.98	6.76	6.75
XII — - 216 -	50.40	14.58	7.08	14.48	7.40	7.59
XIII — - 240 -	47.51	14.48	6.70	13.00	6.30	6.51
XIV — - 264 -	50.30	14.68	7.48	14.40	6.92	7.05
XV — - 288 -	59.82	14.02 14.64	7.26	13.48	6.22	6.69
XVI — - 312 -	56.64	13.56	7.10	13.52	6.42	7.08

Donc, dans notre échantillon d'orge, il ne s'est montré de pouvoir fermentatif protéolytique (trypsique) sensible qu'au quatrième jour de germination, après les trois jours de mouillage. Mais il se manifeste alors avec tant d'énergie que déjà au sixième jour de germination, il aura presque atteint son maximum, se maintenant assez constant jusqu'au treizième jour de germination, c-à-d. tout le temps qu'on en a suivi la marche. A la méthode de maltage dont on se sert, c'est, en

général, justement au quatrième jour de germination, à peu près, que la germination commence à aller bon train: les racines poussent vite, la respiration se fait vive, le tas de malt se chauffe, la saccharification s'avive aussi.

Parmi les chiffres du tableau, ceux de la deuxième et de la troisième colonnes présentent aussi de l'intérêt. Si l'azote total, extrait de l'orge séchée à l'air, dépasse tant celui des échantillons trempés et des échantillons provenant des premiers jours de germination, cela tient, sans doute, exclusivement, à la division plus fine au premier cas. Cependant, l'orge séchée à l'air rend relativement beaucoup moins de l'azote soluble, de celui qui échappe à la précipitation par l'acide tannique: on en a la même quantité absolue que donne l'échantillon du troisième jour de germination. La raison en est simplement que ces substances se trouvent en très petite quantité, tant que les enzymes protéolytiques n'ont pas agi dans le grain même. Du reste, on est frappé de ce que, à tous les essais sauf le premier, le rapport entre l'azote total et l'azote imprécipitable par le tannin est près de 1:2, ce que j'ai constaté presque toujours, aussi pour les extraits de malt avec lesquels j'ai opéré ailleurs. On voit donc que ce rapport ne change pas, quand même la germination se continue 5 jours au-delà du stade auquel le malt vert est à terme. L'explication en est probablement qu'il est impossible aux enzymes protéolytiques de dédoubler beaucoup plus de l'azote en présence, ce qu'ont montré aussi les essais fréquents d'autodigestion que j'ai faits avec des extraits de malt.

L'augmentation de la teneur en eau et la diminution des matières sèches pendant le mouillage et la germination — par suite, en grande partie, de la respiration — sont des faits bien connus. Les chiffres que j'ai trouvés à ce sujet s'accordent bien, je crois, à ceux trouvés par d'autres.

Si, comme l'indiquent Windisch et Schellhorn et comme je le considère assez probable, les différentes orges varient beaucoup, on pourrait trouver des courbes tout autres que celle que j'ai tracée ici. Celle-ci ne prétend aussi à autre chose qu'à représenter un type, et encore un type qui n'indique que la marche du pouvoir fermentatif trypsique. Peut-être que l'enzyme pepsique apparaît à un stade bien antérieur. En effet, les essais que nous allons communiquer tout à l'heure, montrent une action notable déjà au grain d'orge non germé.

Il serait très intéressant de suivre les changements anatomiques du grain d'orge en examinant les tissus les plus riches en matière protéique, les cellules d'aleurone, pendant la germination pour découvrir, si possible, quel est l'endroit où apparaissent les enzymes

protéolytiques: l'embryon, les cellules d'aleurone ou ailleurs. C'est ce que j'ai essayé aussi sans réussir cependant à mener à fin mes recherches d'après le plan que j'avais fait. Comme résultat essentiel j'ai pu confirmer ce que H. T. Brown et G. Harris Morris¹⁾ communiquent à ce sujet dans leur magnifique travail: „Researches of the germination of some of the gramineæ“.

Simultanément avec l'entrée de la protéolyse vive, on aurait dû s'attendre à des changements correspondants aux couches des cellules d'aleurone. Mais ceci ne paraît pas être le cas. D'après Brown et Morris²⁾, les premiers signes de changements ne se font voir que lorsque la plumule aura dépassé la pointe du grain de 4^{mm}—5^{mm}: alors les granules d'aleurone perdent leur contour sphérique bien dessiné, leurs bords devenant irréguliers, et les parois cellulaires qui étaient très transparentes, commencent à montrer des signes de stratification. Même lorsque la plumule aura atteint une longueur d'environ 100^{mm} et que les autres cellules de l'endosperme seront presque vides d'amidon, des cellules d'aleurone pourront être intactes formant des séries cohérentes. En preuve de leur résistance à des enzymes protéolytiques ils observent, d'après Aimé Girard, que des cellules d'aleurone de froment pourront passer par le tube digestif de mammifères sans se changer.

Dans quelques sections que j'ai examinées, j'ai trouvé, au septième jour de germination, les deux couches d'aleurone extérieures parfaitement intactes et toutes pleines, tandis que la couche intérieure était fortement attaquée et, en quelques endroits, avait presque disparu.

Quelques essais projetés de culture d'embryons d'orge isolés, auxquels je me servais d'orges nues, mises à ma disposition par M. le professeur Westermann, n'ont pas été accomplis non plus, parce que j'étais trop engagé dans d'autres essais. Mais il y a, sur ce terrain, des problèmes anatomico-physiologiques extrêmement intéressants et qu'il ne paraît pas impossible de résoudre. J'espère y revenir un jour.

2. Proenzymes.

Quand même le grain d'orge mûr et non germé ne contient pas d'enzymes protéolytiques, il serait possible que leurs proferments, les proenzymes, ou substances zymogènes, y existent et qu'au moyen de quelque agent soi-disant zymoplastique (acide, température, etc.), celles-ci fussent capables de prendre l'état actif.

¹⁾ Brown and Morris: Journal of the chem. Society, Vol. LVII, 458—528 (1890).

²⁾ I. c. p. 473.

Plusieurs de ces proenzymes, telles que la propepsine et la prochymosine sont bien connues. On sait qu'elles se trouvent dans l'estomac des mammifères et qu'on est en état de les séparer des enzymes actives. Ainsi la propepsine résiste, contrairement à ce qui est le cas pour la pepsine, à l'action des alcalis faibles: on peut l'extraire par une solution de soude et la rendre active en ajoutant un acide (Langley et Edkins¹⁾, Glaessner²⁾). Vines³⁾ pense aussi avoir trouvé aux cruches des népenthés une proenzyme qui n'agit protéolytiquement que par un acide; de même I. Reynolds Green⁴⁾ pense avoir trouvé quelque chose de semblable aux graines en repos de *Lupinus hirsutus*, un extrait glycérinien de celles-ci ne devenant protéolytiquement actif qu'après avoir été traité par un acide étendu en chauffant légèrement.

Déterminé par ces indications, j'ai fait l'essai suivant: Le 6 novembre 1901, on moule un lot d'orge assez finement pour pouvoir en prendre des échantillons uniformes.

On les fait digérer de manières diverses:

- no. 1 100^{gr} de farine d'orge + 300^{cc} d'eau (fo-aq, 35°)
 - 2 — — — — + 300^{cc} d'acide lactique à 0.2 p. c. (fo-lact., 35°)
 - 3 — — — — + 300^{cc} Na²CO³ normal au 1/100 (fo-Na²CO³, 35°)
 - 4 — — — — + 200^{cc} de glycérine + 100^{cc} d'eau (fo-glyc., 35°)

Chaque échantillon est additionné de toluol en abondance. On les agite fréquemment après les avoir placés, à 3 h. du soir, dans des gobelets qu'on met dans un bain-marie qui, ce jour-là, montrait 29°. On les y laisse jusqu'au lendemain à 10 h. 1/2, la température étant alors montée à 35°. Pour empêcher l'évaporation, les gobelets sont couverts de plaques de verre bien ajustées. — Par ce procédé, on pourrait, s'il y avait des substances zymogènes, s'attendre soit à les extraire, soit à les rendre actives (par l'influence de l'acide et de la température). Comme essais témoins on place deux échantillons dans l'armoire glacière, à 5°.

¹⁾ Langley and Edkins: Pepsinogen and pepsin. Journ. of Physiology, III, 246 (1886).

²⁾ Karl Glaessner: Ueber die Vorstufen der Magenfermente, Beitr. z. chem. Physiologie und Pathologie, I, 1 (1901).

³⁾ Sidney-Vines: The proteolytic enzyme of Nepenthes. Annals of Botany XI, 563 (1897).

⁴⁾ Green: On the changes in the proteids in the seed which accompany germination. Philos. Transactions t. 178, B. 39 (1887). — On vegetable ferments. Ann. of Botany, Vol. VII, 83 (1893). — The soluble ferments and fermentation. London 1899, p. 207.

no. 5 100^{gr} de farine d'orge + 300^{cc} d'eau (fo-aq., 5°)
 - 6 — — — — + 300^{cc} d'acide lactique à 0.2 p. c. (fo-lact., 5°)

Dans ces deux cas, il était à croire que les proenzymes, s'il y en avait, ne seraient pas rendues actives; mais que s'il y avait des enzymes actives dans cet échantillon d'orge elles seraient extraites à froid.

Le 7 novembre à 10 h. $\frac{1}{2}$ du matin, lorsqu'on a agité les différents échantillons, un dégagement d'air très vif — causé par une fermentation — s'ensuivit au no. 1. Au no. 3, la farine s'était soulevée. L'agitation donna lieu à un dégagement d'air très vif, accompagné d'une odeur extrêmement désagréable comme d'une fermentation butyrique, mêlée avec de la putréfaction. Ainsi, à la température élevée, le toluol n'avait pas été à même d'empêcher le développement de microbes dans ces échantillons. Aux nos. 2 et 4, pas de signe visible de fermentation. Les nos. 5 et 6 étaient aussi restés parfaitement frais.

A 11 h., tous les échantillons sont filtrés. Le premier liquide filtré trouble est rejeté sur le filtre, mais, à l'exception des nos. 5 et 6, aucun échantillon ne donne de filtrat complètement clair. Le filtrat du no. 3 ayant gardé l'odeur fétide, on ne le fait pas entrer aux essais suivants.

On ajoute aux autres liquides filtrés 10^{cc} de solution de protéine de froment dans de l'acide lactique à 0.2 p. c. pour les extraits contenant déjà cet acide; à 0.4 p. c. pour les autres, de sorte que la concentration d'acide lactique de tous les liquides à essayer soit 0.2 p. c. Comme précipitant on se sert du chlorure stanneux et de l'acide tannique. On dose l'azote avant d'avoir abandonné à eux-mêmes les liquides, à 50°, pendant 2 heures, et après. Dans ces conditions, une enzyme toute formée, s'il en existait, devait se faire reconnaître à ces essais. La solution de protéine contenait, en 10^{cc}, 32^{mg}.76 d'azote. Pour les autres déterminations, voir le tableau suivant.

Ces premiers essais donnant des traits si faibles d'activité protéolytique, on les a répétés le 14 novembre après avoir abandonné à eux-mêmes les extraits, à la température ambiante (18°), additionnés de toluol en abondance. On ne précipite qu'avec le chlorure stanneux. Tous les échantillons semblent inaltérés 7 jours durant. Peut-être qu'alors une transformation de proenzyme en enzyme s'était faite aux extraits acides. Au tableau, ces dernières déterminations sont jointes aux autres, mais entre parenthèses.

Essais nos. { 2201-2230 2241-2251	Az total	Az du liquide filtré du chlorure stanneux		Az du liquide filtré de l'a- cide tannique		Az dédoublé échappé à la précipitation p	
		pour commencer	au bout de 2 heures à 50°	pour com- mencer	au bout de 2 hs. à 50°	du chlorure stanneux	de l'a- cidi- tanni
		mg	mg	mg	mg	mg	mg
fo-aq., 35°	13.02	—	—	—	—	—	—
fo-aq-prot., 35°	—	7 nov. { 9.88 14 — { 10.92	7 nov. { 10.46 14 — { 11.56	4.84 —	4.94 —	7 nov. { 0.58 14 — { 0.64	0.16 —
fo-lact., 35°	16.18	—	—	—	—	—	—
fo-lact-prot., 35°	—	7 — { 12.90 14 — { 14.76	7 — { 14.24 14 — { 16.02	6.90 —	7.30 —	7 — { 1.34 14 — { 1.26	0.40 —
fo-glyc., 35° . . .	11.40	—	—	—	—	—	—
fo-glyc-prot., 35°	—	7 — { 6.80 14 — { 7.60	7 — { 7.80 14 — { 8.40	3.20 —	(2.80) —	7 — { 1.00 14 — { 0.80	(÷ 0.4) —
fo-aq., 5°	6.08	—	—	—	—	—	—
fo-aq-prot., 5° .	—	7 — { 4.86 14 — { 6.02	7 — { 5.52 14 — { 6.28	1.96 —	1.96 —	7 — { 0.66 14 — { 0.26	0.00 —
fo-lact., 5°	5.36	—	—	—	—	—	—
fo-lact-prot., 5°	—	7 — { 4.86 14 — { 5.92	7 — { 5.60 14 — { 6.52	2.00 —	2.12 —	7 — { 0.74 14 — { 0.60	0.12 —

Ces essais indiquent que cet échantillon d'orge contient de la pep-
tase en petite quantité, mais pas de tryptase active tous les essais,
même à 5°, ayant donné des effets peptonisants sensibles. Le fait que
l'extrait acidulé d'acide lactique à 35° a fait voir un effet plus pro-
noncé que les autres et qu'on y trouve aussi un effet trypsique faible,
semblerait bien indiquer l'existence de substances zymogènes tant pour
l'enzyme trypsique que pour l'enzyme pepsique. Pourtant les traits en
sont si petits que je n'en tirerai pas de conclusions plus étendues.
Mais il n'y a pas moyen de douter qu'en général il n'y ait eu des en-
zymes protéolytiques aux extraits, et surtout aux extraits acidulés
d'acide lactique. Pour s'en convaincre, on n'a qu'à comparer ce qu'on
vient de dire aux changements qu'ont subis les extraits abandonnés à
eux-mêmes du 7 au 14 novembre, changements qui tous indiquent un
dédoublément pepsique. Au contraire, pendant ce temps, aucune aug-
mentation du pouvoir fermentatif ne s'est faite, mais plutôt une diminu-
tion. En d'autres mots: il n'y a pas eu de transformation ultérieure de
proenzymes en enzymes actives.

CONCLUSIONS.

Voici, en résumé, les résultats les plus importants de ces recherches :

I. Un extrait aqueux d'orge en germination (de malt vert) possède des propriétés protéolytiques bien prononcées qui pourront se faire connaître, outre par une autodigestion, par le dédoublement de matières albuminoïdes étrangères ajoutées. Un tel dédoublement, comme par exemple celui de la protéine de froment, peut aller quantitativement et qualitativement très loin. Il montre bien la dépendance d'agents extérieurs qui est caractéristique aux actions diastasiques.

II. Au moyen de précipitations par le chlorure stanneux et par l'acide tannique, on peut démontrer deux phases différentes dans la protéolyse de protéine de froment : une phase hydrolytique, formant des albumoses, ou phase pepsique, et une phase aux dédoublements plus profonds, ou trypsique, conduisant à la formation de composés non-protéiques, cristallins.

III. Il faut supposer que les deux phases sont causées par deux enzymes : la peptase et la tryptase, parce qu'elles se comportent différemment vis-à-vis d'agents extérieurs :

1° Les courbes de température des deux actions ne diffèrent pas seulement de forme. Elles ont aussi des points cardinaux différemment situés (le minimum et l'optimum). V. p. 179.

2° Si on arrête la protéolyse au bout de temps différents, l'action total se dessinera de manières différentes : l'action pepsique opère avec rapidité et sera bientôt arrivée à terme, tandis que l'action trypsique, opérant plus lentement, se continue, après la cessation de la première, jusqu'au dédoublement ultérieur de tous les produits de dédoublement pepsiques.

3° L'influence de variations d'un facteur (température, quantité de l'extrait de malt, concentration de la solution de protéine, durée du temps d'essai) dépend de variations simultanées des autres facteurs.

4° A la phase trypsique, la protéolyse paraît ne pas se faire du tout, ou ne se faire que faiblement en milieu neutre. L'addition d'un petit peu d'acide (organique ou minéral) a un effet fortement accélérateur, celle d'un alcali exerce une influence retardatrice sur l'action.

5° L'influence des acides et des alcalis s'explique suivant la théorie de Fernbach et Hubert : ce sont les phosphates primaires et secondaires se trouvant, avec les enzymes, dans l'extrait de malt, qui décident de la marche de la protéolyse, les premiers ayant un effet favorable, les derniers un effet retardateur sur la protéolyse.

6° La phase trypsique de la protéolyse est retardée proportionnellement à la quantité d'alcool ajoutée.

7° Elle est encore retardée en ligne progressive par les antiseptiques suivants: thymol, chloroforme, formol (acide benzoïque, acide salicylique). L'action pepsique paraît moins sensible, en tout cas vis-à-vis du formol. Ni l'action pepsique ni l'action trypsique ne sont sensiblement affaiblies par le toluol, qui, par conséquent, est un bon préservatif du pouvoir fermentatif protéolytique de l'extrait de malt.

IV. La supposition de l'existence de, au moins, deux enzymes protéolytiques est encore supportée par le fait que la précipitation d'un extrait de malt par l'alcool absolu donne une préparation possédant presque exclusivement des propriétés pepsiques, l'influence de l'alcool supprimant le pouvoir trypsique.

V. Parmi les propriétés physiques et chimiques des enzymes il faut signaler:

1° Elles sont presque également solubles dans l'eau, dans l'acide lactique faible et dans la glycérine.

2° Elles ne sont qu'extrêmement peu diffusibles à travers une membrane animale.

3° A l'état sec elles supportent le chauffage lent jusqu'à 95°, pour le moins, tandis qu'en solution elles se détruisent à 70° environ.

4° La congélation d'un extrait de malt n'en détruit pas le pouvoir trypsique. Il faut supposer qu'il en est de même du pouvoir pepsique.

5° La lumière n'a qu'une influence retardatrice minime, si elle en a une, sur la peptase et sur la tryptase.

6° Au contraire, elles sont très sensibles, l'une et l'autre, et surtout la tryptase, à l'influence d'acides et d'alcalis forts, et à celle de plusieurs antiseptiques ordinaires.

7° Abandonnées à elles-mêmes, à une température basse, les enzymes pepsique et trypsique, additionnées de toluol, se conservent assez longtemps. Ceci est le cas surtout pour l'enzyme pepsique.

VI. Les enzymes protéolytiques de l'extrait de malt sont à même de dédoubler des matières protéiques très diverses, tant d'origine végétale que d'origine animale. En voici que dédouble la tryptase en ligne progressive dans l'ordre cité: protéine de malt, protéine de seigle, protéine d'orge, caséine, protéine d'avoine, protéine de froment, légumine. La peptase et la tryptase n'exercent, au contraire, qu'une influence faible sur l'ovalbumine, tandis qu'elles transforment énergiquement la fibrine de bœuf (réaction de tryptophane). A plusieurs égards le dédoublement protéolytique par les enzymes pro-

téolytiques de l'extrait de malt ne le cède ni quantitativement ni qualitativement à celui qu'opèrent la pepsine et la trypsine animales.

VII. La peptase forme rapidement des produits de dédoublement protéolytiques de la protéine de froment un grand nombre d'albumoses dont la tryptase continue le dédoublement formant peu à peu des composés non protéiques, cristallins. Les vraies peptones ne se montrent qu'en très petit nombre servant, probablement, d'intermédiaires entre les albumoses et les produits cristallins. Ces transformations se manifestent par l'augmentation rapide de composés azotés diffusibles et par la formation de substances qui se soustraient à la précipitation par l'acide tannique, par l'acétate uranique et par l'acide phosphotungstique (corps amidés, bases hexoniques, etc.). Parmi les produits de dédoublement, on trouve de l'ammoniaque en abondance.

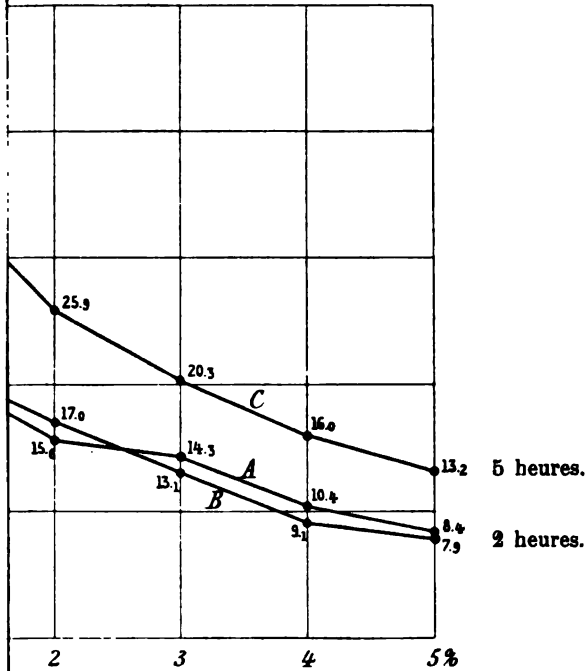
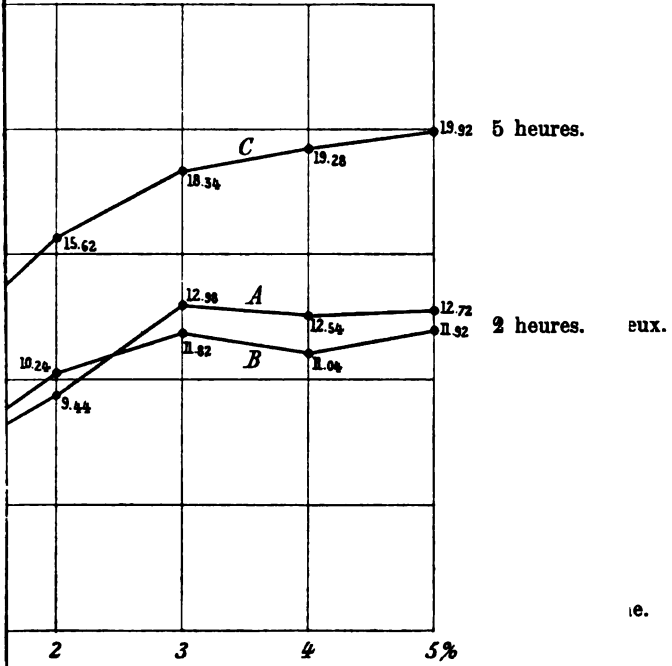
VIII. Dans le grain d'orge non germé je n'ai pu démontrer qu'un pouvoir fermentatif pepsique extrêmement faible, et point de pouvoir fermentatif trypsique. Je n'ai pas non plus pu démontrer l'existence de celui-ci pendant 3 jours de trempe, ni pendant les 3 jours de germination suivants. Mais au quatrième jour de germination, il a paru tout d'un coup avec grande force, atteignant son maximum déjà au sixième jour de germination. Dès lors, il s'est maintenu presque constant jusqu'au treizième jour de germination, c'est à dire tant qu'on en a suivi la marche.

IX. Il paraît qu'on peut démontrer, dans le grain d'orge non germé, la présence de petites quantités de proenzymes tant pour la peptase que pour la tryptase. On peut les rendre actives par l'action d'acide lactique faible et d'une température convenable.

(Voir aussi les Pls. I—XVII).



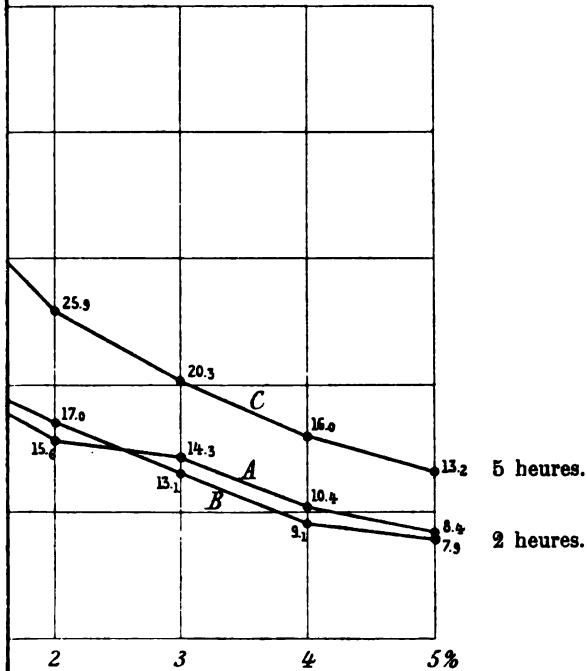
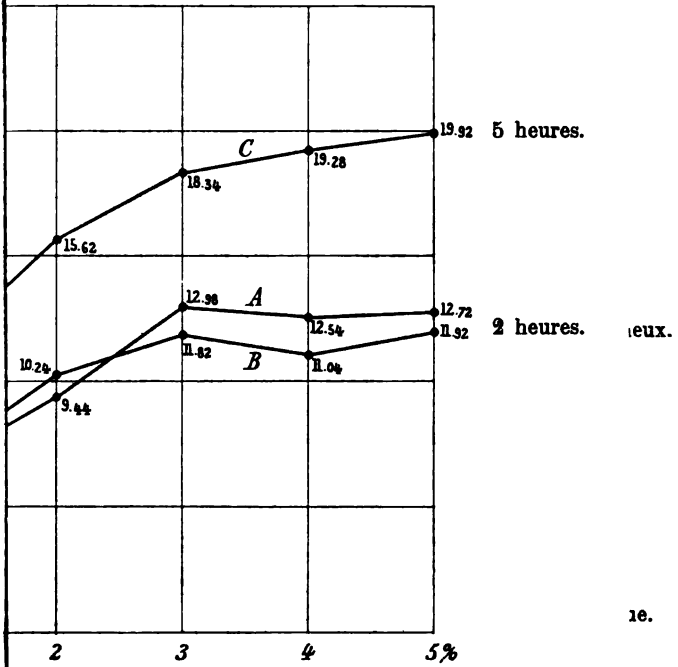
Pl. III.



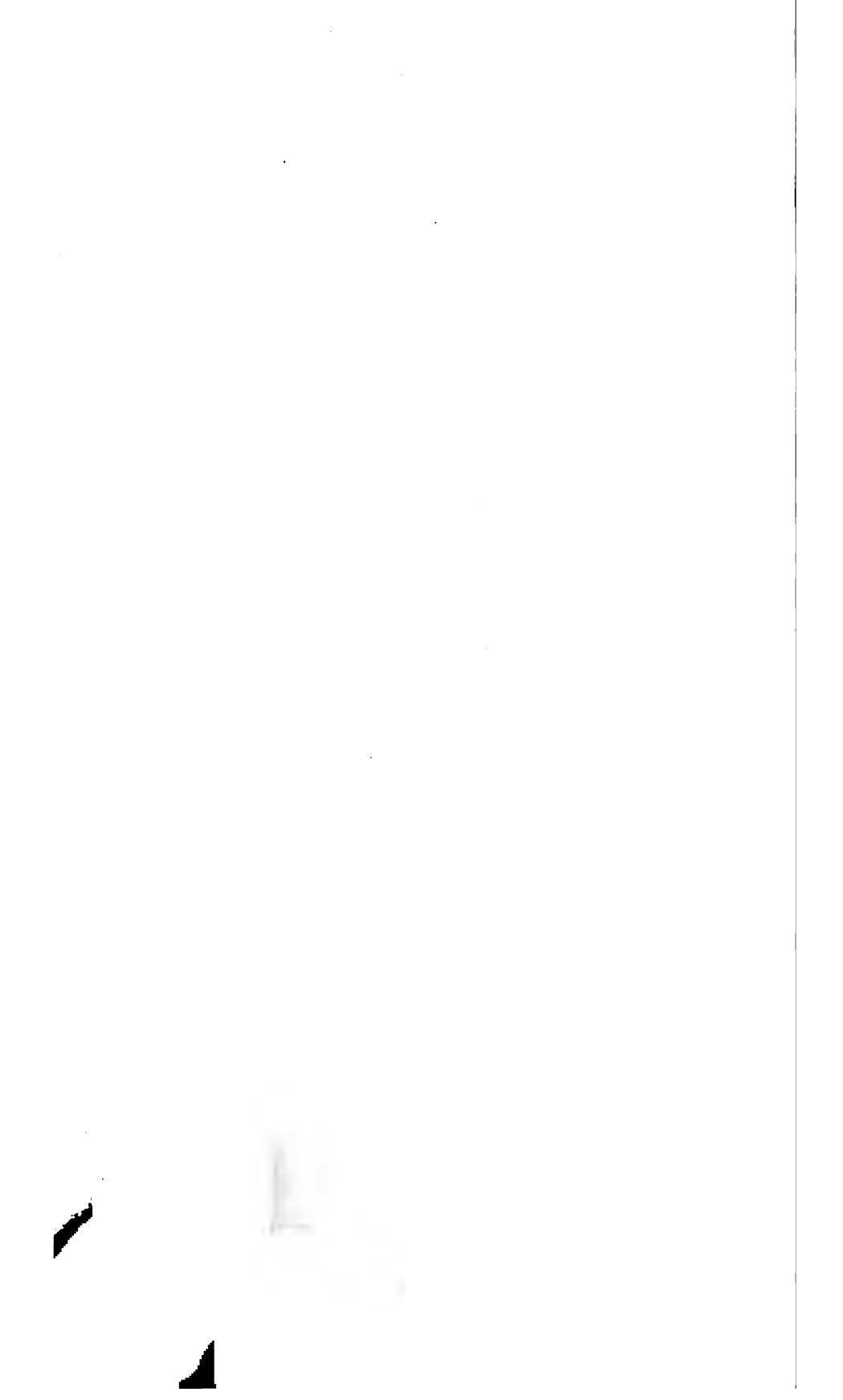
centration de la solution de p



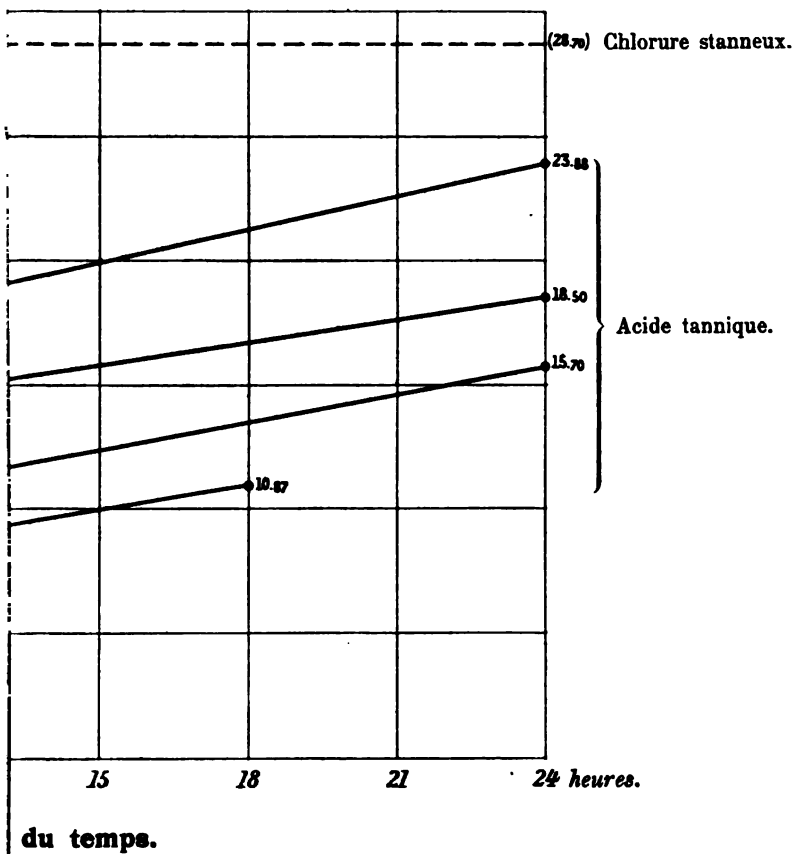
Pl. III.

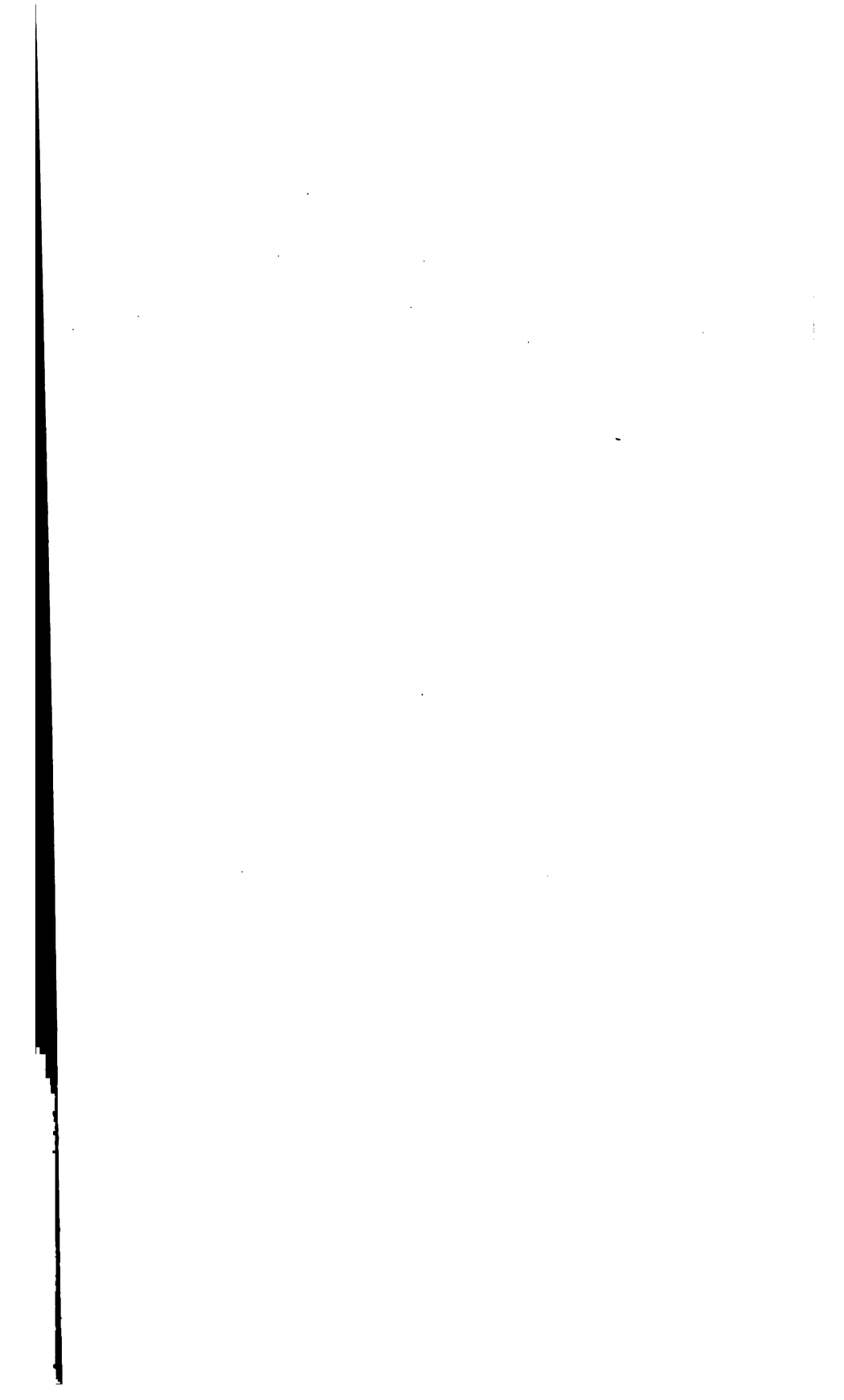


centration de la solution de protéine.



Pl. IV.



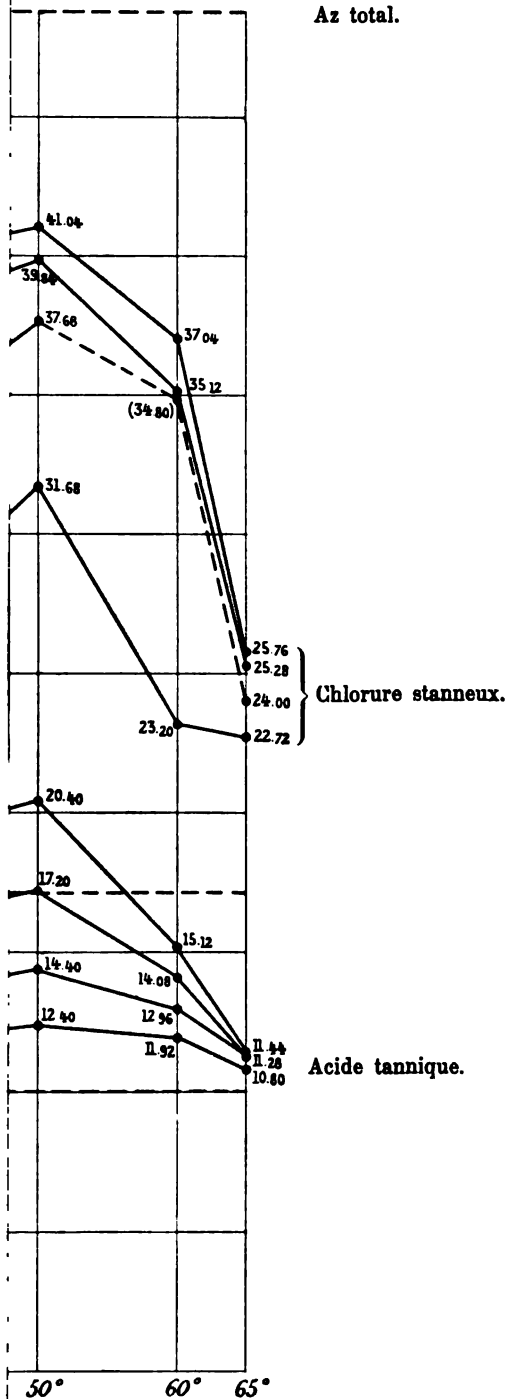






Pl. VII.

Az total.

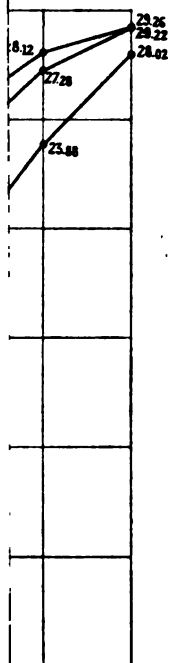


Chlorure stanneux.

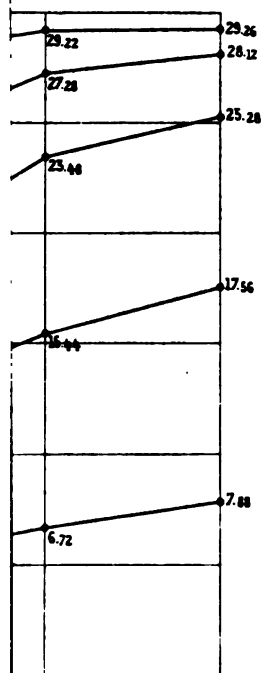
Acide tannique.

températures différentes.

Pl. VIII.



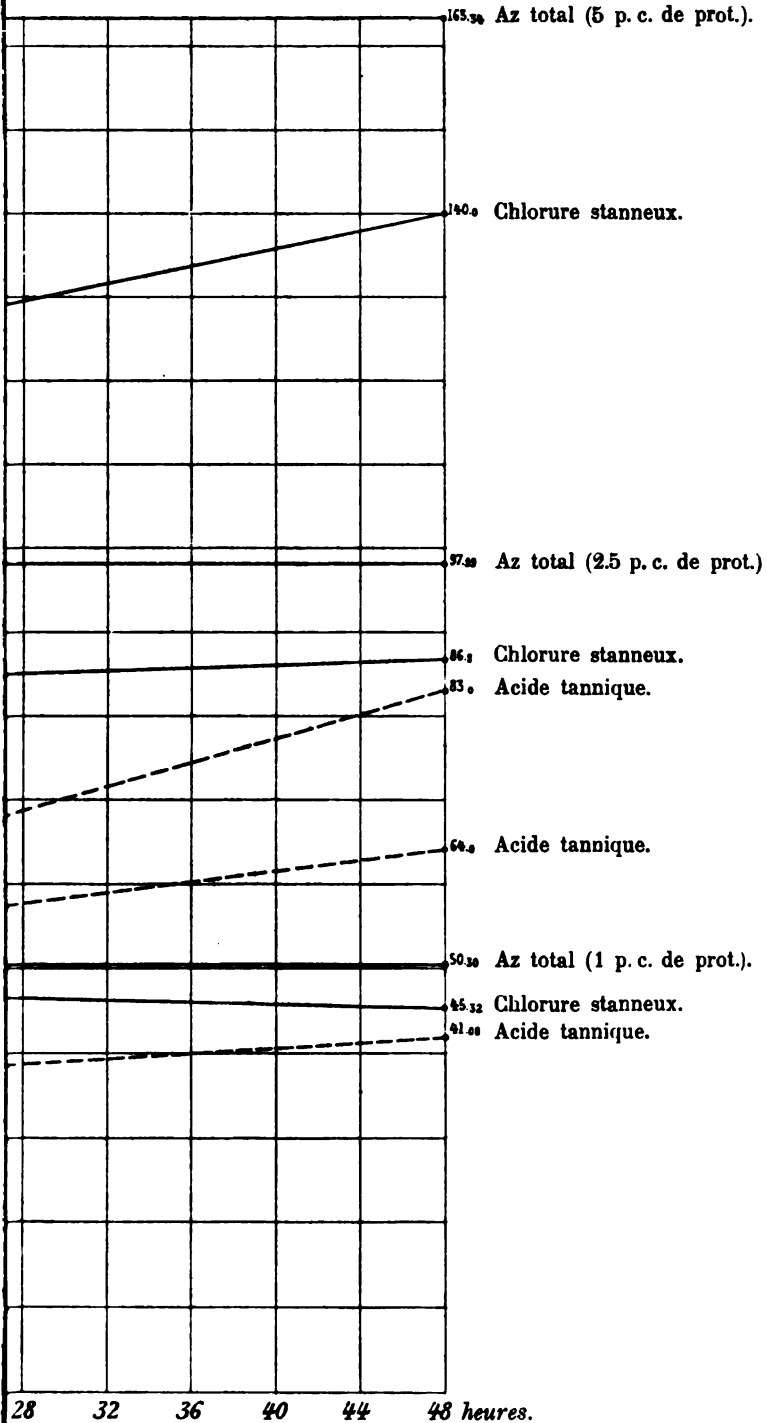
8 10 centimètres cubes d'extrait de malt.



2 3 heures.

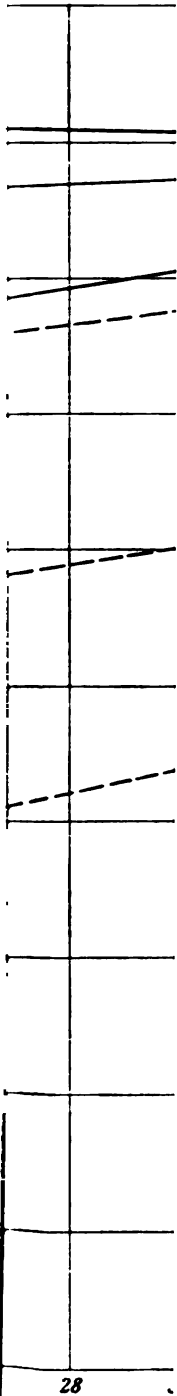
tés de ferment différentes.

Pl. IX.



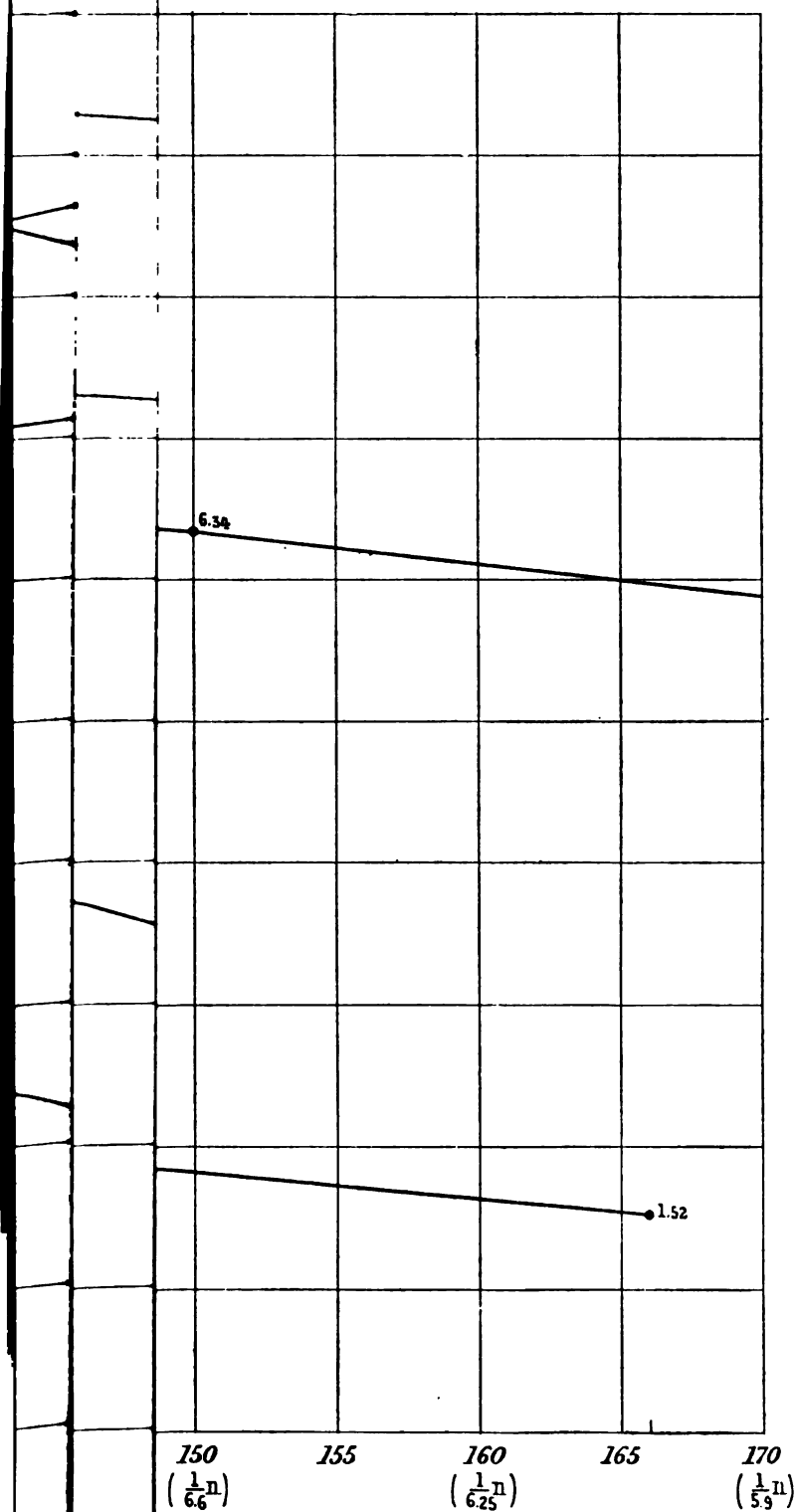
Evolution de protéine différentes.

—



rations de p

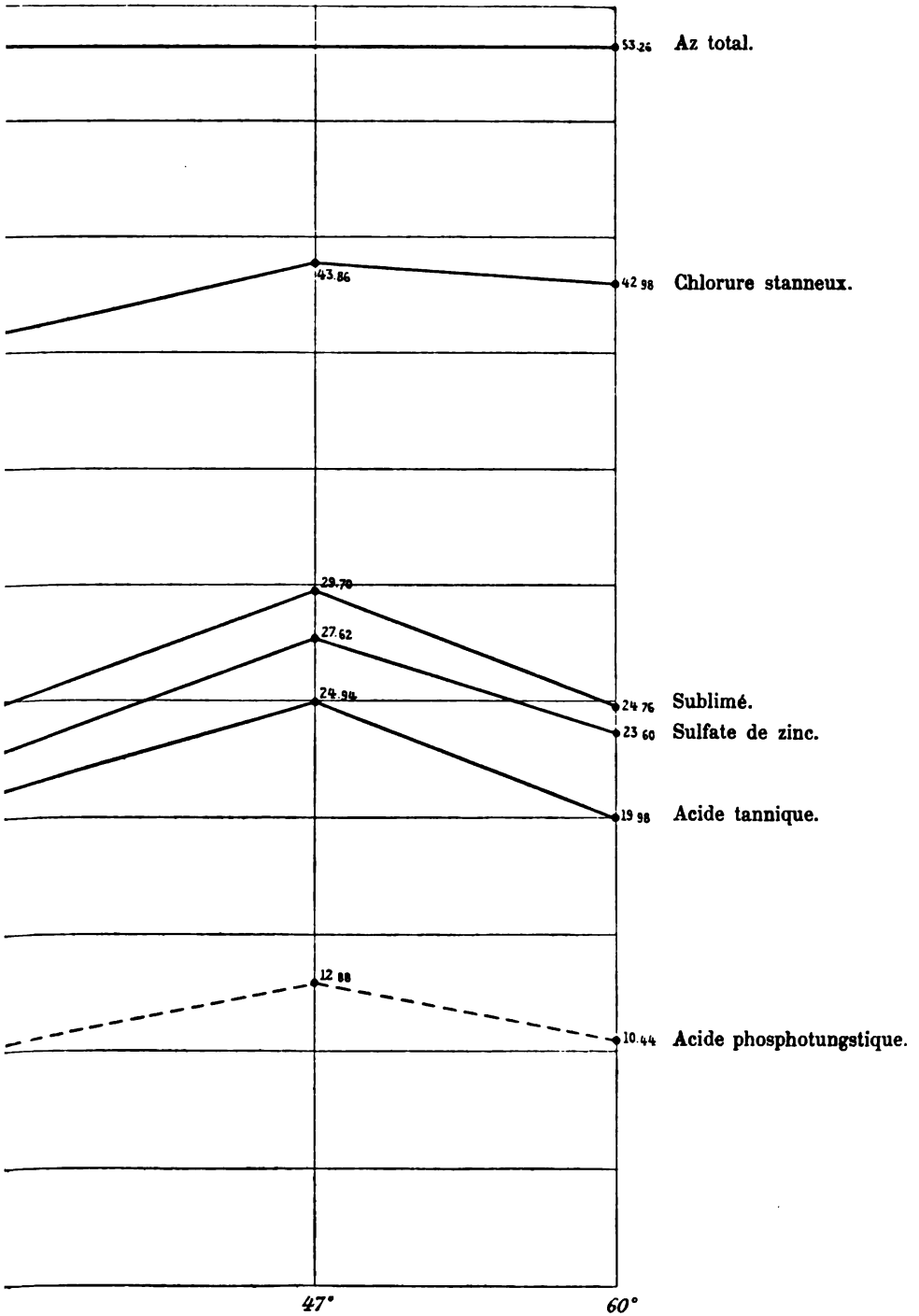




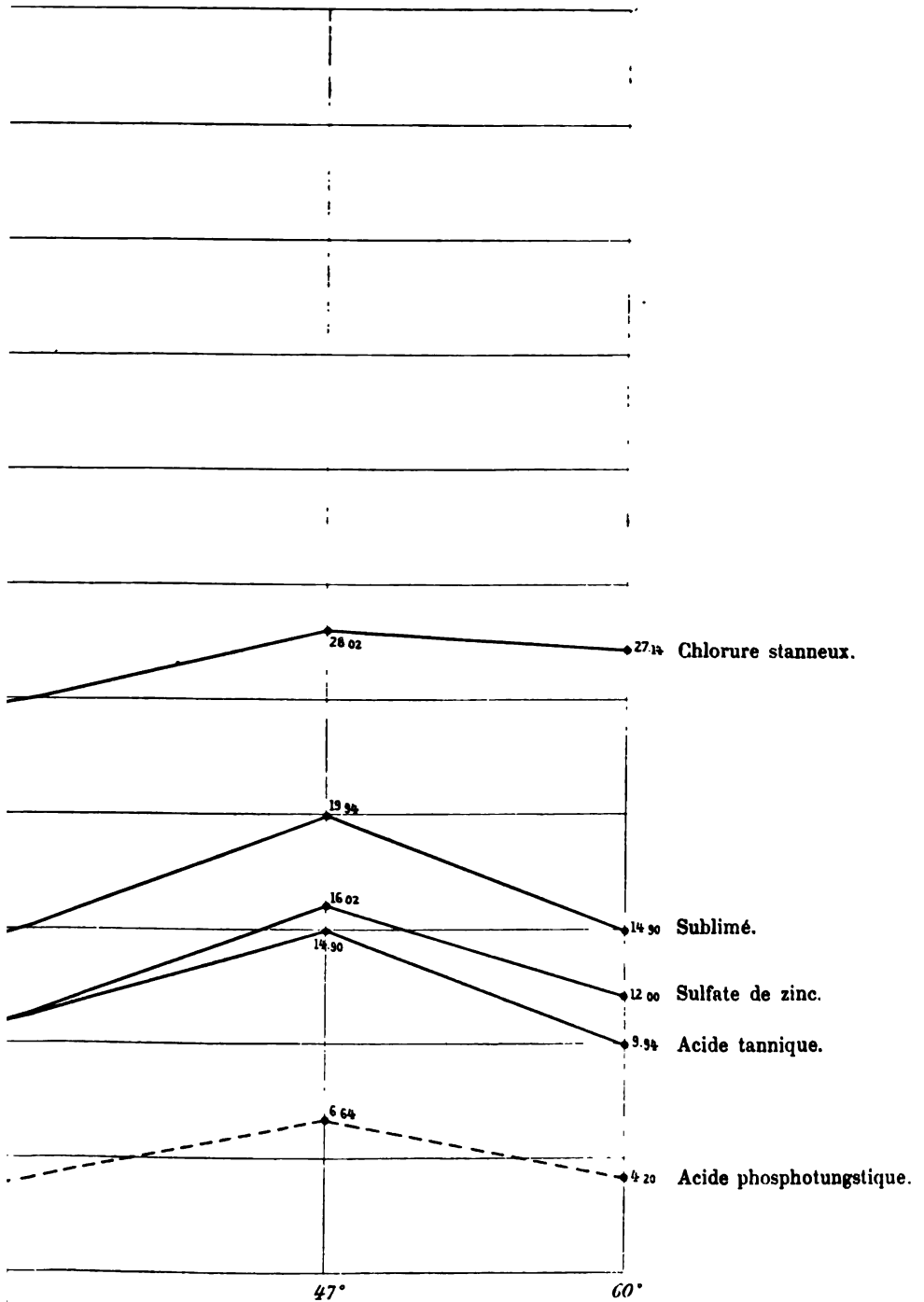






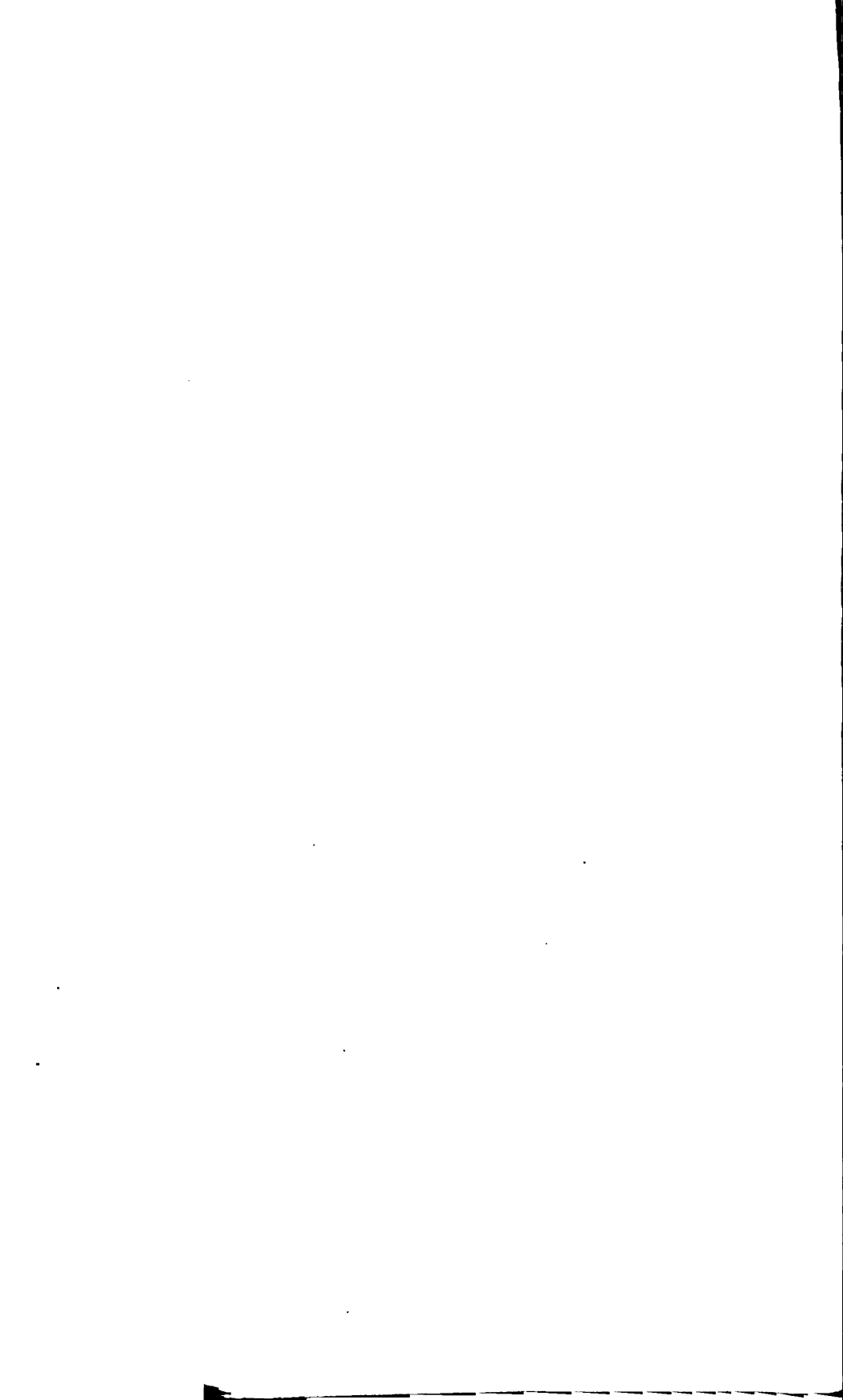


protéolytiques.
températures différentes.)



protéolytiques.

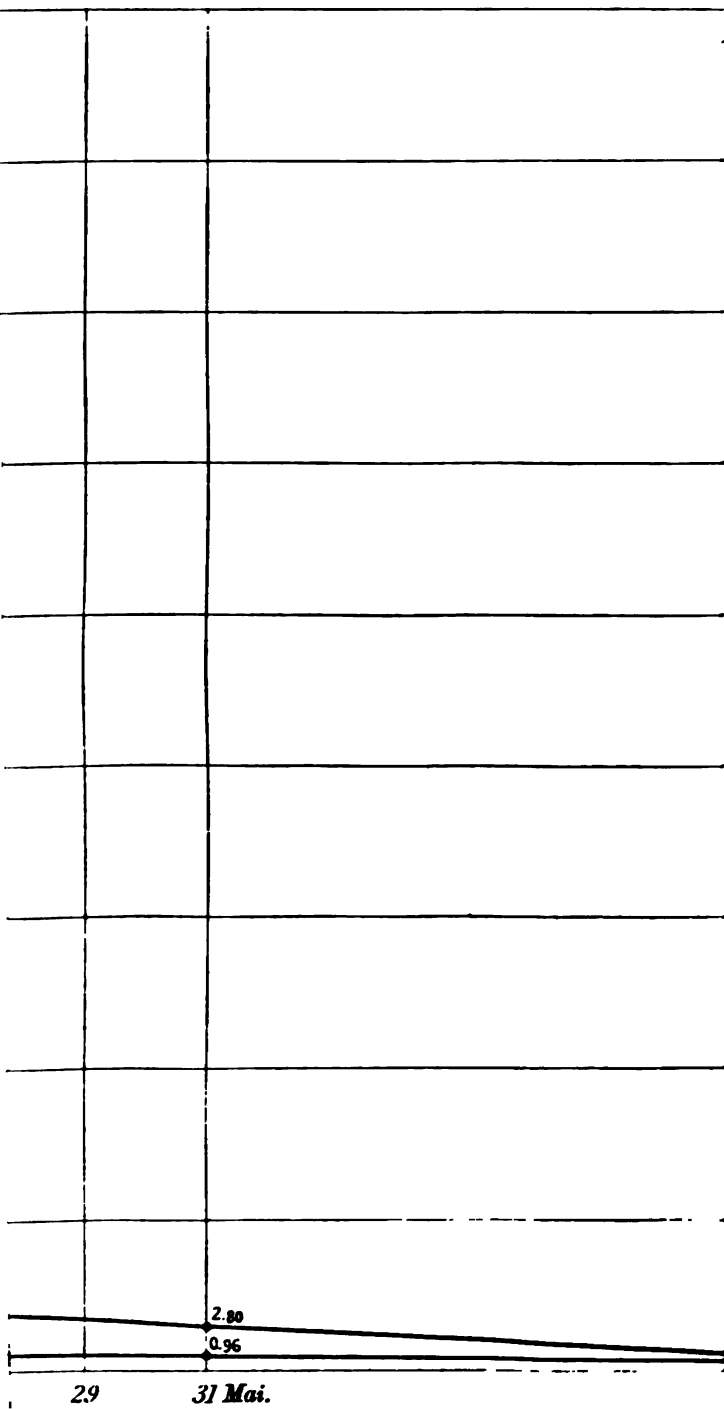
(à températures différentes.)



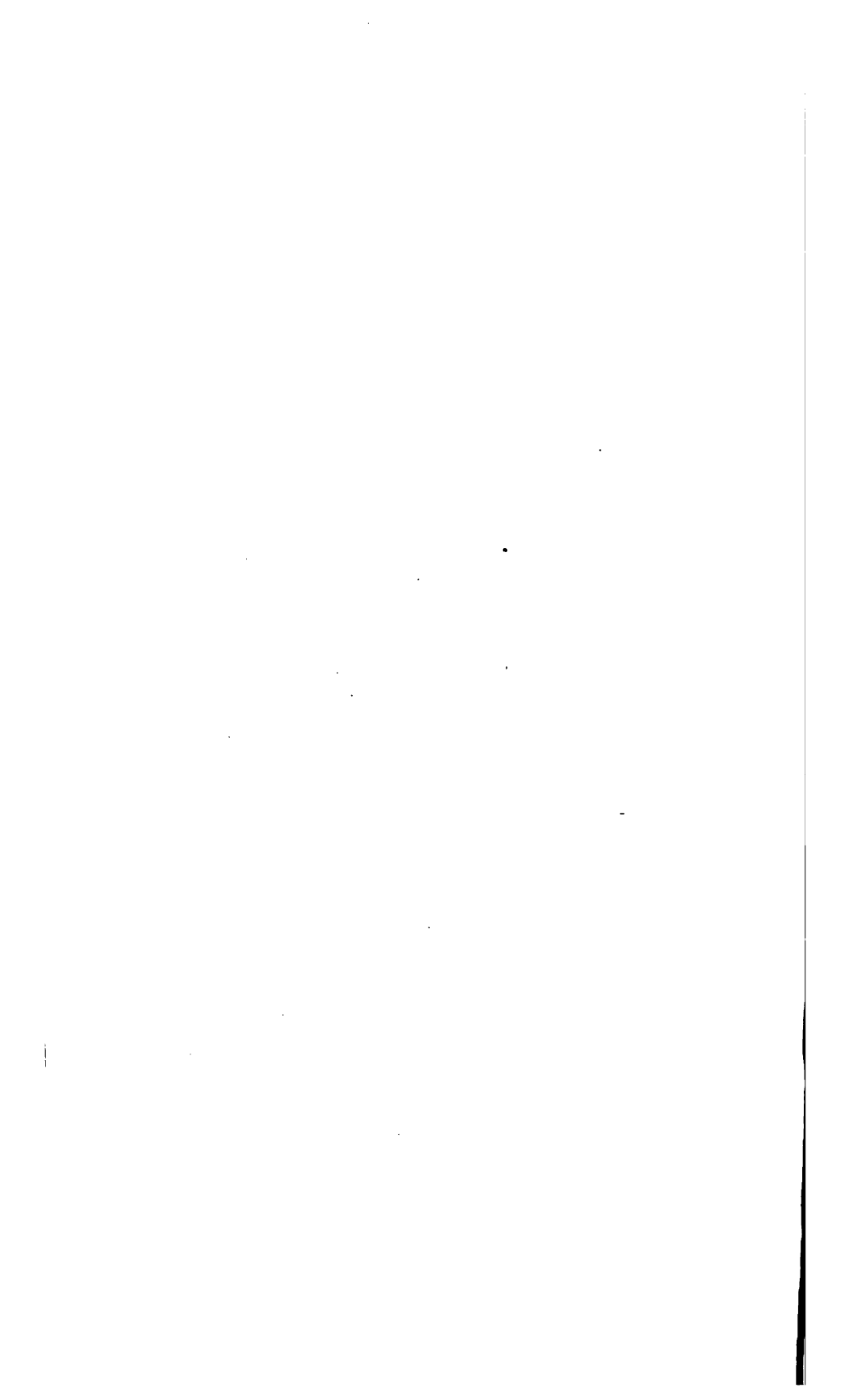


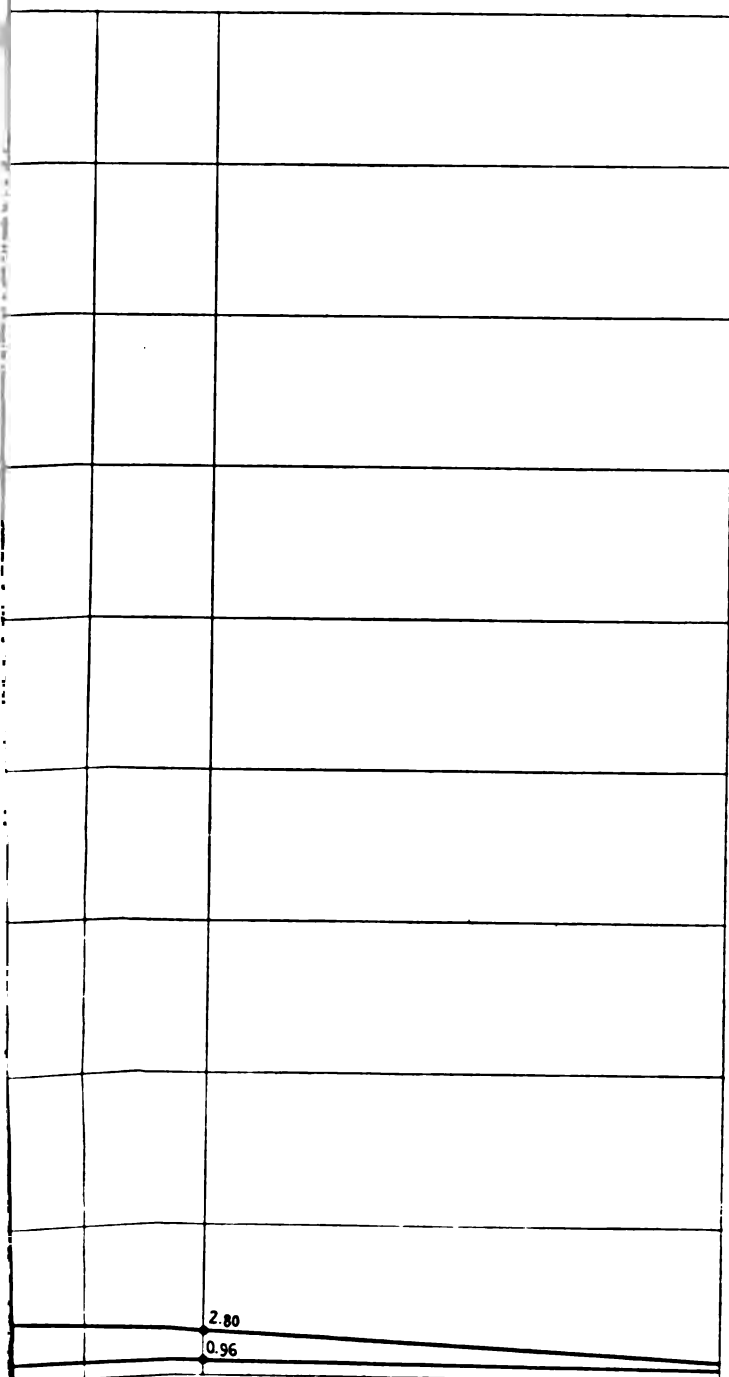
édoubl
le 3 heu





le diffusion.





le diffusion.





